

**Zur Harnausscheidung
von 17-Ketosteroiden bei Bullen
und Kälbern**

Wilhelm Binder

Aus dem Institut für Physiologie und Ernährung
der Tiere der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Vorstand: Professor Dr. Dr. Johannes Brüggemann

ZUR HARNAUSSCHIEDUNG VON 17-KETOSTEROIDEN
BEI BULLEN UND KÄLBERN

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der veterinär-medizinischen Doktorwürde
an der Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

von

Wilhelm Binder

St. Leonhard



5349/60

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan:	Professor Dr. Karl Z i p f
Referent:	Professor Dr. Dr. Joh. Br ü g g e m a n n
Tag der Promotion:	28. 7. 1959

"UNI"-DRUCK - München 13, Amalienstr. 85

GEWIDMET
MEINER LIEBEN FRAU

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. EINLEITUNG	1
II. LITERATUR	2
A. Charakteristik der Nebennierenrindenhormone	2
1. Zur Geschichte und Darstellung der Hormone	2
2. Benennung der Steroide	2
3. Einteilung in Gruppen	3
4. Wirkung der Hormone	4
5. Physiologie der Steroide	5
B. Sekretionsleistung der Nebennierenrinde	6
1. Normale Sekretion	6
2. Sekretionssteigerung durch	
a) A C T H	7
b) andere Substanzen	7
C. Biosynthese der Nebennierenrindenhormone	8
1. Synthetisierung des Pregnenolons aus Cholesterin	8
2. Synthetisierung der wichtigsten Hormone aus Pregnenolon	8
3. Angenommenes Syntheschema	9
D. Abbau und Ausscheidung der Steroide	10
1. Umwandlung der Steroide im Organismus	10
2. Ausscheidung durch die Nieren	10
E. Möglichkeiten zur Bestimmung der Funktion der Nebennierenrinde	10

III. MATERIAL UND METHODIK

A. Versuchstiere	13
B. Methodik	13
1. Gewinnung des Harnes	14
a) von Kälbern	14
b) von Bullen	14
2. Einleitende Arbeiten zur Harnanalyse	15
a) Quantitative Messung des Harnes	15
b) Messung des spezifischen Gewichtes des Harnes	15
c) Vorbereitung des Äthers	15
3. Analyse des Harns	16
a) Bestimmung der ungereinigten 17-Ketosteroide	16
aa) Reagentien	16
bb) Hydrolyse	16
cc) Extraktion	16
dd) Aufspalten in saure, neutrale und phenolische Anteile	17
ee) Abdestillieren des Extraktionsmittels	17
b) Bestimmung der gereinigten 17-Ketosteroide durch Aufspaltung in ketonische und nichtketonische Anteile nach der Girard-Methode	18
aa) Reagentien	19
bb) Umwandlung der ätherlöslichen Ketosteroide in wasserlösliche Hydrazone	19
cc) Spaltung der Hydrazone durch Hydrolyse	20
dd) Abdestillieren des Extraktionsmittels	20
4. Messung des Harnrückstandes mit Hilfe der m-Dinitrobenzolreaktion nach Zimmermann	20
5. Feststellung des Filterschwerpunktes	22
6. Anfertigen der Eichkurve	22

	Seite
IV. ERGEBNISSE	25
V. DISKUSSION DER ERGEBNISSE	36
1. Zur Exkretion der neutralen 17-Ketosteroide bei Jungrindern	37
2. Zur Exkretion der neutralen 17-Ketosteroide bei Bullen	38
VI. ZUSAMMENFASSUNG	39
LITERATURVERZEICHNIS	41

I. EINLEITUNG

Bei der Erforschung der Funktion der Nebennierenrinde beim Nutztier er-
fährt die Frage der Aktivitätsprüfung dieses Organs besondere Aktualität.
In diesbezüglichen Untersuchungen hat sich bisher die Bestimmung der
17-Ketosteroide im Harn bei Tieren als brauchbares Maß erwiesen, die
Leistung der Nebennierenrinde zu beurteilen (4, 17, 27, 47 u.a.). Trotz-
dem sind auch hier noch eine Reihe von Problemen ungelöst, wie bei-
spielsweise die Spezifität der Fraktion der 17-Ketosteroide für die tatsächliche
Nebennierenrindenfunktion. Weiterhin sind im Schrifttum noch Unklarhei-
ten enthalten über das zu wählende Bezugssystem der im Harn exkretierten
Steroidfraktion. Diese Probleme werden besonders dadurch deutlich, daß
von Nutztieren insgesamt noch verhältnismäßig wenig Ketosteroidwerte
vorliegen.

Es ist mir daher von Herrn Professor Dr. Dr. Johannes Brüggemann die Auf-
gabe gestellt worden, zunächst weitere Normalwerte von Jungtieren und Be-
samungsbullen zu gewinnen. Hierbei soll ein besonderes Augenmerk auf
die Spezifität dieser Fraktion für die Nebennierenrindenfunktion gerichtet
werden unter besonderer Berücksichtigung der Frage eines brauchbaren
Bezugssystems der ermittelten Harnwerte.

II. LITERATUR

A. CHARAKTERISTIK DER NEBENNIERENRINDENHORMONE

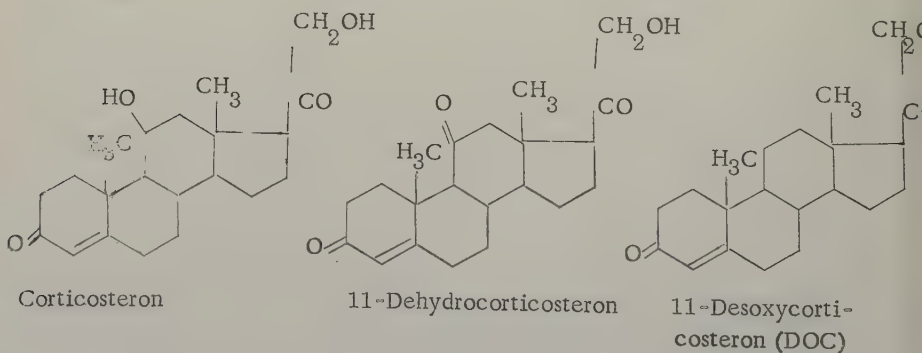
1. Zur Geschichte und Darstellung der Hormone

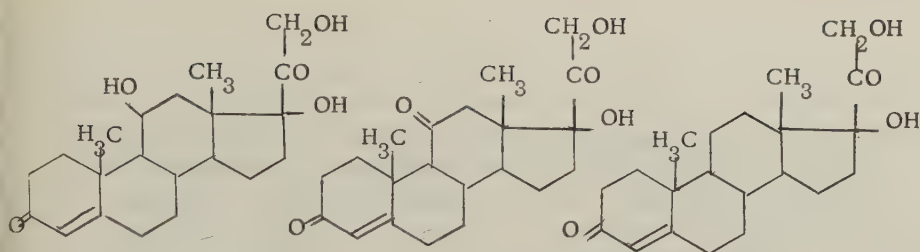
Die Erforschung der Funktion der Nebennierenrinde ist noch nicht alt. Ihren ersten großen Impuls erhielt dieser Zweig der Physiologie, als es um 1930 Swingle und Pfiffner (4) erstmals gelang, aus Nebennieren Extrakte zu gewinnen, die bei nebennierenlosen Tieren lebenserhaltend wirkten. Nach 1935 konnten dann Kendall (22), Reichstein (36, 37, 38) und Wintersteiner aus diesen Extrakten neue Steroide kristallisieren.

2. Benennung der Steroide

Die Benennung der Steroide kann von verschiedenen Gesichtspunkten aus vorgenommen werden. Entweder man benennt sie nach ihrer chemischen Struktur und der im Molekül enthaltenen Anzahl von C-Atomen oder aber nach den funktionellen Gruppen, die an einzelnen C-Atomen substituiert werden können. Letzteres dürfte wohl auch für die physiologische Betrachtungsweise befriedigender sein.

Nach diesem Schema wurden auch die sechs von den insgesamt 28 Stoffen benannt, die bisher aus wirksamen Extrakten der Nebennieren herauskristallisiert werden konnten. Sie haben folgende Konstitution (45):





17-Oxycorticosteron

11-Dehydro-17-oxy-
corticosteron
(Cortison)

11-Desoxy-17-oxy-
corticosteron

Diesen sechs Steroiden ist gemeinsam eine α, β -ungesättigte Ketogruppe am C-Atom 3 und eine reduzierende Ketoalkoholkette am C-Atom 17. Sie unterscheiden sich aber durch die Substituenten am C-Atom 11 und 17.

3. Einteilung der Gruppen

Bei der Einteilung in Gruppen kann auch wieder von verschiedenen Systemen ausgegangen werden. Erstens kann man grobschematisch nach der Zahl der C-Atome unterteilen, wie es bei Hoppe-Seyler-Thierfelder (18) und von Junkmann (20) vorgeschlagen wird.

Außerdem empfiehlt Zimmermann (57) eine Einteilung nach den chemischen Charakteristika der hervorstechendsten funktionellen Gruppen. So teilt er nach den Gruppen an den C-Atomen 3, 11 und 17 ein; bei jenen handelt es sich meist um eine Keto- oder Hydroxylgruppe. Je nach dem Vorhandensein einer Ketogruppe an den einzelnen C-Atomen spricht er von einem 3-, 11- bzw. 17-Ketosteroid. Hängt eine Hydroxylgruppe an einem gesättigten Ring, spricht er von alkoholischen Steroiden; ist die Hydroxylgruppe an einem aromatischen Ring, dann von einem phenolischen Steroid; bei Vorhandensein der Ketolkonfiguration $\text{CO}-\text{CH}_2\text{OH}$ von reduzierenden Steroiden.

Ferner wurden die Steroidhormone nach ihrer Wirkungsweise eingeteilt; Je nach ihrem Einfluß auf den Kohlehydrat-, Eiweiß- oder Mineralstoffwechsel in Gluko-, N-(=Nitrogen), oder Mineralocorticoide.

Staudinger (45) möchte die Bezeichnung "Corticoide" oder "Harncorti-

coide" nur für die durch eine Gruppenreaktion erfaßbaren, im einzelnen nicht genau definierten Metaboliten der Nebennierenrindenhormone mit der noch erhaltenen, charakteristischen, reduzierenden COCH_2OH -Gruppe am C-Atom 17 vorbehalten wissen, während der Ausdruck "Nebennierenrinden-hormon" oder "Corticosteroid" als Gruppenbezeichnung für die bekannten biologisch aktiven Stoffe dieser Art verwendet werden sollte. "Corticoide" wären somit alle im Harn vorkommenden Pregnan- oder Pregnen-20-on-21-ol-Derivate, gleichgültig, ob sie bei gleichzeitig vorhandener α, β -ungesättigter Ketogruppe am C-Atom 3 biologisch aktiv sind oder nicht.

4. Wirkung der Hormone

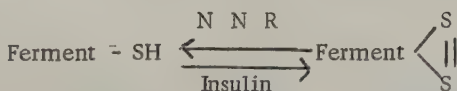
Zur Überprüfung der Wirkung der Steroidhormone wurden hauptsächlich biologische Methoden angewandt. Diese beruhen darauf, festzustellen, welche Ausfallerscheinungen eintreten, falls dem Organismus durch Epinephrektomie diese Hormone entzogen werden bzw. welche Ausfallerscheinungen kompensiert werden durch das Verabreichen solcher Steroidkörper.

Man spricht einem Steroid die sog. Cortinwirksamkeit zu, wenn es die Fähigkeit besitzt, einen mehr oder weniger großen Teil der Ausfallerscheinungen beim nebennierenlosen Tier zu ersetzen. Diese typische Cortinwirksamkeit ist an das Vorhandensein einer α, β -ungesättigten Ketogruppe am C-Atom 3 und einer reduzierenden Ketoalkolkette am C-Atom 17 geknüpft (13). Das Vorhandensein oder Nichtvorhandensein weiterer Sauerstoffatome am C-Atom 11 und 17 kann diese Wirkung nur modifizieren. Die Eigenschaft, eine Nebennierenrindenausfallerscheinung zu kompensieren, geht fast ganz verloren, wenn die Alkoholgruppe am C-Atom 21 fehlt oder wenn sich die Ketogruppe am C-Atom 3 oder 20 befindet, oder wenn die Doppelbindung aufgegeben wird. Gleichfalls ist die Verbindung biologisch inaktiv, wenn noch eine Doppelbindung am C-Atom 6 (13, 14) liegt, oder andere Substituenten an anderen Stellen des Moleküls eingeführt werden. Daraus ergibt sich, daß die Hormonwirkung an eine ganz bestimmte spezifische Konstitution gebunden ist. Aus dem Dargelegten erklärt sich auch, daß synthetisch hergestellte Hormone, die die Ketoalkolseitenkette in aromatischen oder hydroaromatischen Ringsystemen enthalten, keine oder höchstens sehr geringe Wirkung im epinephrektomierten Tier haben.

5. Physiologie der Steroide

Die physiologische Wirkung der Steroidkörper ist im einzelnen noch sehr wenig erforscht und stützt sich hauptsächlich auf Hypothesen. So unterzieht Laszt (23) alle bisherigen Veröffentlichungen über den Wirkungsmechanismus der Nebennierenrindensteroiden einer scharfen Kritik. Er bezweifelt die Möglichkeit, eine Gruppierung der wirksamen Nebennierenrindenhormone nach funktionellen Gesichtspunkten vornehmen zu können, da nach seiner Ansicht viele Stoffwechselreaktionen nicht primär auf die Wirkung der Nebennierenrindenhormone zurückgehen, sondern unter Mitbeteiligung anderer Funktionskreise zustande kommen. So hat er mit Verzar (25) nachgewiesen, daß die Natrium- und Wasserverschiebungen bei Nebennierenrindeninsuffizienz durch Störungen im Kohlehydratstoffwechsel osmotisch bedingt seien.

Laszt hat nun eine eigene Hypothese über die Wirkung der Corticosteroide entwickelt: Er geht dabei von der Konstitutionsspezifität der Nebennierenrindensteroiden aus und hebt vor allem die Reduktionsfähigkeit speziell der Ketoalkoholgruppe hervor, während die Wirkung des Insulins über seine Disulfidbindungen verstanden wird. Dieses besitzt Oxydationsvermögen im Gegensatz zum Nebennierenrindenhormon. Normalerweise soll nach seiner These ein bestimmtes Gleichgewicht zwischen Nebennierenrindenleistung und Insulinproduktion bestehen. Auf Grund seiner Untersuchungen nimmt er an, daß die Gruppe der Nebennierenrindenhormone u.a. die Bildung und durch ihr Reduktionsvermögen die Aktivität der thiolhaltigen Fermente reguliert (24).



Tatsächlich enthalten die meisten Fermente, bei denen Laszt annimmt, daß die Nebennierenrinde sie beeinflusst, eine SH-Gruppe. Für die Wirkungsintensität der verschiedenen Nebennierenrindensteroiden macht er verschiedene Faktoren verantwortlich, wie Umwandlungsgeschwindigkeit, Reaktionsgeschwindigkeit, Reduktionsstärke und nicht zuletzt durch die Struktur bedingte, physikalisch-chemische Eigenschaften.

B. DIE LEISTUNG DER NEBENNIERENRINDE

1. Normale Inkretion

Die ersten Untersuchungen über die Sekretionsleistung der Nebenniere wurden von M. V o g t vorgenommen (55). Sie bediente sich biologischer Methoden. Die Versuche wurden am lebenden Tier unter Bestimmung der Corticosteroide im Nebennierenvenenblut nach dem Test von S e l y e und S c h e n k e r (43, 52) durchgeführt. Nach ihren Ergebnissen wird von der Nebenniere pro Minute das Zehnfache des jeweiligen Gehaltes der Drüse an Steroiden produziert. Dieser Befund macht die enorme Sekretionsleistung der Nebenniere deutlich (51).

Ferner wurde auch die chemische Zusammensetzung des biologisch aktiven Inkretionsproduktes aufgeklärt. N e l s o n, S a m u e l s, R e i c h und Z a f f a r o n i (29, 30, 35) konnten im Nebennierenvenenblut von Hunden mit papierchromatographischen Untersuchungsmethoden feststellen, daß die hauptsächlichsten Vertreter der Nebennierenrindenhormone 17-Oxycorticosteron und Corticosteron darstellen, daneben kommen noch geringe Mengen anderer Steroide mit α , β -ungesättigter Ketogruppe vor.

Die Ergebnisse konnten auch von B u s h (5) an verschiedenen Tierarten bestätigt werden. Nach seinen Befunden ist aber das mengenmäßige Verhältnis von 17-Oxycorticosteron zu Corticosteron von Tierart zu Tierart verschieden, d.h. die Nebennierenrinde einer bestimmten Tiergattung produziert diese beiden Hormone in einem für diese Tierart spezifischen Verhältnis.

P i n c u s und Mitarbeiter (15, 34) untersuchten die Hormone der Nebenniere an isolierten, perfundierten Drüsen. Dabei ließen sie die 20 g schwere Rindernebenniere von einem Liter Rinderblut pro Stunde durchströmen. Durch diese Versuche konnten sie feststellen, daß außer den übrigen, biologisch wirksamen Corticosteroiden - ausgenommen 11-Desoxy-17-oxycorticosteron - auch noch andere unbekannte Steroide von der Nebennierenrinde produziert werden. Er nannte diese Steroide "Unbekannte" I - X. Da sie auf den Papierchromatogrammen durch ihre reduzierende Wirkung erkannt werden, ist anzunehmen, daß sie am C-Atom 17 ebenfalls die α -Ketoalkoholseitenkette tragen.

2a) Produktionssteigerung durch ACTH

Es konnte auch festgestellt werden, daß durch Belastung des Organismus die Hormonausschüttung gesteigert wird. Diese Leistungssteigerung wird von der Hypophyse durch das adrenocorticotrope Hormon (ACTH) veranlaßt. Dabei ist hervorzuheben, daß durch die ACTH-Stimulierung in erster Linie wieder Corticosteron und 17-Oxycorticosteron vermehrt gebildet werden (6, 30, 31, 41). Dieselbe Beobachtung konnte P i n c u s bei seinen Versuchen machen, als er dem Perfusionsblut ACTH beimgab (15, 34). Es werden aber auch die anderen Steroide und die von ihm gefundenen, unbekannten Ketole von der Nebennierenrinde vermehrt ausgeschieden, allerdings nicht in so hohem Maße wie Corticosteron und 17-Oxycorticosteron.

2b) Sekretionssteigerung durch andere Substanzen

Vogt (54) konnte außerdem zeigen, daß ACTH auch am hypophysektomierten Tier eine Mehrausscheidung von Corticosteroiden aus der Nebennierenrinde hervorruft. Dasselbe kann durch Zusatz von Adenosintriphosphat und Kaliumionen zum durchströmenden Blut des hypophysektomierten Tieres erreicht werden (54).

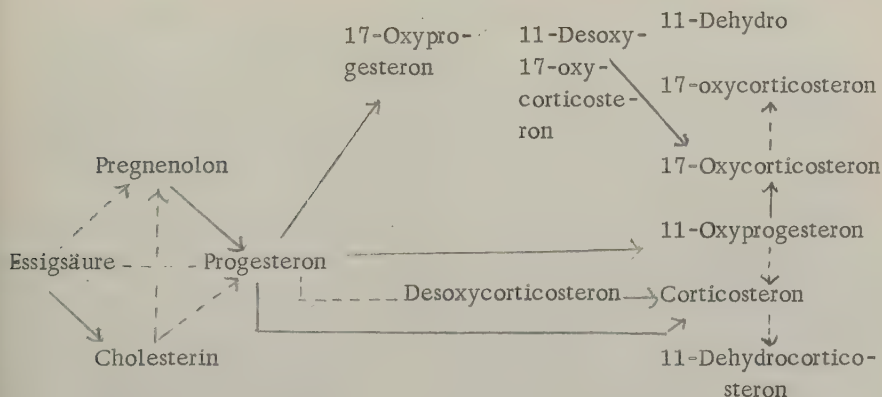
Nachdem es gelang, auch im Nebennierenbrei oder in Nebennierenschnitten Desoxycorticosteron in Corticosteron bzw. 17-Oxy-11-desoxycorticosteron in 17-Oxycorticosteron überzuführen, kurz die 11-Oxylierung möglich wurde (7, 9, 10, 11, 12, 21, 32, 39, 40, 44, 48, 50), konnten noch weitere Stoffe auf ihre Wirkung auf die Umwandlungsgeschwindigkeit geprüft werden. Eine nennenswerte Steigerung der Hormonsynthese konnte ferner erreicht werden durch Zusatz von Ascorbinsäure, Fumarsäure, Vitamin A und Vitamin E zum Nebennierenhomogenat.

In diesem Zusammenhang ist noch zu erwähnen, daß Adrenalin beim hypophysenlosen Tier keine Wirkung zeigt in bezug auf eine Mehrausscheidung von Corticosteroiden, während bei intakter Hypophyse Adrenalin eine enorme Steigerung der Corticosteroidsekretion aus der Nebennierenrinde verursacht (33).

Diese Reaktionen können durch ACTH nicht mehr beeinflusst werden. Dadurch wird gezeigt, daß der Angriffspunkt des ACTH schon vorher liegt und zwar in der Stimulierung der Synthese des Pregnenolon (34).

3. Angenommenes Syntheschema

Pincus (15) hat auf Grund seiner Versuchsergebnisse ein Schema aufgestellt über die möglichen Zwischenstufen bei der Biosynthese der Nebennierenrindenhormone.



Bei diesem Schema sind die gesicherten Übergänge mit durchgehenden Strichen gezeichnet, die nur vermuteten werden gestrichelt.

D. ABBAU UND AUSSCHIEDUNG DER STEROIDE

1. Umwandlung der Steroide im Organismus

Die von der Nebennierenrinde sezernierten Hormone werden im Organismus bei der Erfüllung ihrer spezifischen, biologischen Aufgaben chemisch verändert und abgebaut. Der genaue Ort der Inaktivierung ist nicht bekannt, da diese auch stattfindet, wenn dem Tier Darm, Leber und Nieren fehlen (53). Jedoch ist sicher, daß die ungesättigte Ketogruppe in der Leber sehr rasch reduziert wird (42).

2. Ausscheidung durch die Nieren

Die inaktivierten Metaboliten der Nebennierenrinde werden in erster Linie über die Niere ausgeschieden. In geringem Maße werden die Abbauprodukte der Nebennierenrindenhormone auch durch die Galle exkretiert. Im Harn liegen die chemisch veränderten Metaboliten der Nebennierensteroide als neutrale 17-Ketosteroide vor. Durch die Bestimmung dieser Steroidgruppe können Rückschlüsse auf den Funktionszustand der Nebennierenrinde (14, 57) und der Hypophyse gezogen werden, da nach B a h n e r die Nebennierenrinde ohne Hypophysenvorderlappeneinfluß ein "schlummerndes Organ" ist (2).

E. MÖGLICHKEITEN ZUR BESTIMMUNG DER FUNKTION DER NEBENNIERENRINDE

Es gibt verschiedene Methoden, die Funktionstüchtigkeit der Nebennierenrinde zu überprüfen. Hierbei kann im lebenden Organismus leider nicht das Organ selbst zu einer Beurteilung seiner Leistungsfähigkeit herangezogen werden. Infolgedessen ist die Funktionsbeurteilung der Nebennierenrinde entweder nur durch die im Harn ausgeschiedenen Stoffwechselprodukte möglich, oder durch Stoffwechseländerungen anderer von der Nebennierenrinde beeinflusster Organe. Somit ergeben sich folgende Möglichkeiten:

1. Die 17-Ketosteroidausscheidung im Urin
2. Die Corticoidausscheidung im Urin
3. Der Corticoidspiegel im Blut zu messen.

Weitere Beurteilungsmaßstäbe bestehen in der Beobachtung folgender Reaktionen, die allerdings nicht immer volle Spezifität besitzen:

1. Die Änderung der Eosinophilenzahl des Blutes
2. Der Gehalt des Blutes an Na, Ka und Cl
3. Die Wasserausscheidung im Urin im Zusammenhang mit der Wasserbilanz des Körpers
4. Die Stoffwechselveränderungen im Kohlenhydratstoffwechsel.

In der vorliegenden Arbeit soll die Nebennierenrindenaktivität durch Bestimmung der neutralen 17-Ketosteroide im Harn untersucht werden. Auf eine Schilderung der verschiedenen Varianten dieser Untersuchungsmethode wird verzichtet, da eine erschöpfende Darlegung der chemisch-methodischen Möglichkeiten dieser Analyse bereits in der Dissertation von S t o c k veröffentlicht wurde (47).

In diesem Zusammenhang muß erwähnt werden, daß Holcombe (17) und Meschaks (27) bei weiblichen Rindern bereits 17-Ketosteroid-Bestimmungen durchgeführt haben. Allerdings hat Holcombe (17) nur einzelne Harnportionen zur Untersuchung herangezogen und die ermittelten mg/Liter-Werte auf ein durchschnittliches spezifisches Gewicht des Harnes von 1,035 bezogen.

Es wird deshalb nötig sein, einige in der 17-Ketosteroidbestimmung bei Rindern noch offene Fragen zu untersuchen. Zunächst interessieren Normalwerte wachsender Rinder, dann aber solche von Bullen, nachdem hierüber praktisch keine verlässlichen Werte vorliegen. Hierbei soll insbesondere überprüft werden, welches Bezugssystem für die ermittelten Werte letztlich Gültigkeit besitzt und ob es berechtigt ist, wie von klinischer Seite versucht wurde, mit Einzelharnportionen zu arbeiten statt mit der 24-Stunden-Menge.

Zu diesem Zweck wurden mir sowohl Kälber als auch mehrere Bullen zur Bestimmung der Ausscheidung von 17-Ketosteroiden im Harn zur Verfügung gestellt. Letztere verdanke ich der Klinik für Tiergeburtshilfe und Behandlung von Außenfällen, wofür an dieser Stelle bereits mein Dank ausgesprochen ist.

III. MATERIAL UND METHODIK

Zunächst wurde die 17-Ketosteroidausscheidung im Harn von Jungrindern untersucht. Drei Tiere waren zu dieser Zeit vier Monate, die restlichen fünf Monate alt. In jeder Altersklasse waren je zwei männliche Tiere und ein weibliches Tier. Von diesen Kälbern wurde der 24-Stunden-Harn auf die gesamten, ausgeschiedenen, neutral reagierenden 17-Ketosteroide und auf die mit dem Girard-T-Reagenz gereinigten 17-Ketosteroide untersucht.

Weiterhin wurden sechs Bullen zu den Ketosteroiduntersuchungen herangezogen. Diese Zahl mag gering erscheinen, jedoch muß bemerkt werden, daß diese Tiere nicht nur einmal, sondern mehrfach untersucht wurden. Zunächst sind die Messungen bei reichlicher Grünfutter- und geringer Heugabe im Spätfrühjahr und dann bei fast ausschließlicher Heufütterung und geringer Kraftfuttergabe im Herbst vorgenommen worden. Bei den Bullen A und B wurde der 24-Stunden-Harn auf die gesamten, neutral reagierenden 17-Ketosteroide und auf die mit dem Girard-T-Reagenz gereinigten 17-Ketosteroide untersucht. Bei den übrigen vier Bullen wurden ebenfalls die 24-Stunden-Harnportionen nach den oben genannten Verfahren analysiert. Danach ist der Gehalt an neutralen 17-Ketosteroiden mehrerer, im Verlauf eines Tages abgesetzter Harnportionen bestimmt worden, d. h. es wurde der innerhalb bestimmter Zeitabstände abgesetzte Harn einzeln analysiert. Bei diesen Untersuchungen wurden die mit Girard-T-Reagenz gereinigten Ketosteroide nicht bestimmt, da infolge des langwierigen Analysenganges, der für diese Methode nötig ist, die einzelnen Harnportionen längere Zeit hätten konserviert werden müssen. Es erschien aber erforderlich, unterschiedliche Ketosteroidwerte auf Grund von Wartezeiten zu vermeiden (S t o c k , 47). Aus diesem Grunde wurde der am Morgen und im Verlauf des Tages abgesetzte Harn am selben Tage analysiert. Nur der Abend- und Nachtharn ist am darauffolgenden Tage aufgearbeitet worden. Auf diese Weise konnten die durch längeres Aufbewahren bedingten Fehlerquellen vermieden werden. -

Die im Versuch stehenden Bullen wurden regelmäßig zweimal wöchentlich abgesamt.

A. VERSUCHSTIERE

- | | |
|---------------|---|
| Jungrind I. | Jungbulle, Höhenfleckvieh, vier Monate alt. |
| Jungrind II. | Jungbulle, graubraunes Höhenvieh, Zwilling zu III, 4 Monate alt. |
| Jungrind III. | Kalbin, graubraunes Höhenvieh, Zwilling zu II, 4 Monate alt. |
| Jungrind IV. | Jungbulle, Höhenfleckvieh, 5 Monate alt. |
| Jungrind V. | Jungbulle, graubraunes Höhenvieh, 5 Monate alt. |
| Jungrind VI. | Kalbin, graubraunes Höhenvieh, 5 Monate alt. |
| Bulle A. | Höhenfleckvieh, 1 1/2 Jahre alt. |
| Bulle B. | Höhenfleckvieh, Herdbuchtier, 1 1/2 Jahre alt, ist jedoch befruchtungsunfähig, da im Ejakulat keine Spermien vorhanden sind. Im histologischen Bild des Hodens waren keine Samenzellen zu finden. |
| Bulle C. | Höhenfleckvieh, etwa 3 Jahre alt. Von diesem Bullen wurden Teilportionen auf den Gehalt an 17-Ketosteroiden analysiert. Die drei Teilportionen eines Tages bestanden aus Harn, der innerhalb von 8 Stunden (7 - 15 Uhr, 15 - 23 Uhr, 23 - 7 Uhr) abgesetzt wurde. |
| Bulle D. | Höhenfleckvieh, etwa 2 Jahre alt. Dessen Harn wurde in 2 Untersuchungsperioden im Abstand von 3 Monaten auf den 17-Ketosteroidgehalt untersucht. In der ersten Meßperiode wurde hauptsächlich der 24-Stunden- und 8-Stunden-Harn-Wert bestimmt. In der zweiten Untersuchungsperiode sind von einem Tag mehrere Harnportionen einzeln analysiert worden. |
| Bulle E. | Höhenfleckvieh, 1 1/2 Jahre alt; dessen Harn wurde ebenfalls zweimal im Abstand von 3 Monaten untersucht. |

In der ersten Periode wurden im 24-Stunden-Harn und in mehreren von einem Tag stammenden Harnportionen die 17-Ketosteroide bestimmt, in der zweiten kamen ausschließlich einzelne Harnportionen eines Tages zur Verarbeitung.

Bulle F.

Höhenfleckvieh, 2 1/2 Jahre alt.

Von diesem Bullen wurden ebenfalls 24-Stunden-Harn und Teilportionen auf den Gehalt an 17-Ketosteroiden untersucht.

B. METHODIK

In diesem Abschnitt wird die angewandte Methode beschrieben, die u.a. in der Dissertation von S t o c k (47) schon ausführlich behandelt worden ist.

1. Gewinnung des Harnes

Es kam bei dieser Arbeit darauf an, daß jeweils der gesamte, innerhalb festgesetzter Zeiten abgesetzte Harn gewonnen wurde. Aus diesem Grunde mußten Vorrichtungen verwendet werden, die diese Anforderungen sicher gewährleisten.

- a) Für die Jungrinder wurden Stoffwechselkäfige verwendet, in die auch die Kälber gebracht wurden. In diesen Käfigen stehen die Tiere auf einem groben Drahtrost, durch den auch Faeces und Harn fallen können. Unter dieser Auflage befindet sich ein dichter Maschendraht, auf dem der Kot liegen bleibt, während der Harn durch einen darunter befindlichen Trichter in ein Gefäß abläuft, das mit einem aufgesetzten Sieb vor Verunreinigungen mit Kot- und Futterresten geschützt ist.
- b) Bei den Bullen wurde ein trichterförmiger Gummibeutel mit Hilfe von Gurten am Präputium so befestigt, daß er sich auch bei Lageveränderungen des Tieres nicht verschiebt. Am ventralen Ende des Gummi-

trichters ist mit diesem ein Schlauch wasserdicht vernäht. Der Schlauch wird durch eine Öffnung durch den Fußboden geführt und mündet in einen darunter gestellten 25 Liter fassenden Steingutbottich. Trotz der Sicherung von Gurten war der Sitz des Urinals öfter zu überprüfen.

Die Harngefäße wurden nach der Auswechslung intensiv gereinigt und vor der erneuten Verwendung getrocknet.

2. Einleitende Arbeiten zur Harnanalyse

a) Quantitative Messung des Harnes

Der Harn in den Sammelgefäßen wird gut durchmischt, damit die Homogenität gewährleistet ist. Hiernach läßt man den Harn literweise in einen 1-Liter-Meßzylinder ab und bestimmt so seine Menge. Von jeder Meßzylinderfüllung wird ein kleiner Teil in ein Gefäß abfiltriert, damit am Schluß ungefähr 200 - 300 ccm filtrierter Harn zur Analyse vorliegen.

b) Messung des spezifischen Gewichtes des Harnes

Der filtrierte Harn wird in einen weiten Zylinder gegossen und das spezifische Gewicht reduziert auf eine Temperatur von 15°C festgestellt. Dabei ist darauf zu achten, daß das Aräometer an der Wand des Zylinders nicht festhaftet und so Fehlresultate entstehen.

c) Vorbereitung des Äthers

Da der Äther zur Extraktion nur verwendet werden darf, wenn er frei von Peroxyden ist, muß er zuvor mehrmals destilliert werden. Die Destillation wird so vorgenommen, daß ungefähr 100 ccm Vorlauf und ebensoviel Rückstand verworfen werden. Um festzustellen, ob der Äther peroxydfrei ist, wird eine Probe auf Peroxyde vorgenommen: Etwa 10 ccm des zu untersuchenden Äthers werden mit Salzsäure angesäuert und mit einigen Kristallen Kaliumjodid p. A. durchmischt. Sind Peroxyde vorhanden, tritt sofort eine Gelbfärbung auf, da ionisiertes Jod zu elementarem Jod oxydiert wird. Der Äther muß dann noch so oft abdestilliert werden, bis die Probe etwa eine Minute farblos bleibt.

3. Analyse des Harns

a) Bestimmung der ungereinigten 17-Ketosteroide

aa) Reagentien

konz. Salzsäure p.A.
peroxydfreier Äther
gesättigte Natriumbicarbonatlösung
1n Natronlauge.

bb) Hydrolyse

Da es sich bei den neutralen 17-Ketosteroiden um stabile Verbindungen handelt, darf hier energisch hydrolysiert werden. Hierdurch werden die wasserlöslichen Glucuron- und Schwefelsäureester der Steroide gespalten. Erst nachher können die Steroide mit einem mit Wasser nicht mischbaren Lösungsmittel extrahiert werden.

Zur Hydrolyse werden genau 50 ccm des filtrierten Harns in einen 250ml Schliffkolben gegeben, dazu 5 ccm konz. Salzsäure p.A. Das Gemisch wird 15 Minuten unter Rückfluß gekocht. Nach dem Abkühlen wird die nun dunkel gefärbte Flüssigkeit in einen 250ml Scheidetrichter überführt.

cc) Extraktion

Zur Extraktion werden organische Lösungsmittel verwendet. Von diesem Extraktionsmittel - in der vorliegenden Arbeit kam Äther zur Verwendung - werden 50 ccm zu dem im Scheidetrichter befindlichen Harnhydrolysat gegeben und 5 Min. kräftig geschüttelt. Nur durch kräftiges Schütteln kann eine vollständige Extraktion erzielt werden. Hiernach läßt man den Scheidetrichter stehen, bis sich die wässrige Phase von der Ätherphase getrennt hat. Nach dem Absitzen wird die wässrige Harnphase in einen zweiten 250-er Scheidetrichter abgelassen, der wiederum geschüttelt wird, nachdem 25 ccm Äther zugegeben wurden. Sobald sich auch dieses Gemisch getrennt hat, wird die wässrige Harnphase vorsichtig abgelassen, damit kein Äther verlorengeht. Sie kann anschließend verworfen werden. Die beiden Ätherauszüge werden dann in einem Scheidetrichter vereinigt. Der Schliffkolben, in dem die Hydrolyse durchgeführt wurde, und der leere Scheidetrichter werden mit den für die folgenden Arbeitsgänge benötigten Lösungen nachgespült.

Es ist möglich, daß sich bei den Ausschüttelungen Emulsionen bilden. Diese können bis zu einer Stunde und länger bestehen bleiben. In diesem Falle versucht man eine Trennung durch kurzes Schütteln mit 20 ccm 10%iger Natronlauge herbeizuführen. Muß auf diese Weise eine Trennung von der Äther- und Harnphase herbeigeführt werden, dann ist die Ketosteroidbestimmung jedoch von zweifelhaftem Wert, da die Hormonausbeute nicht mehr vollständig ist.

dd) Aufspaltung in saure, neutrale und phenolische Anteile

Um aus dem Ätherauszug die sauren Bestandteile zu entfernen, wird jener mit 25 ccm gesättigter Natriumbicarbonatlösung 2 Min. ausgeschüttelt. Nach dem Absitzen ist das Natriumbicarbonat abzulassen. Daran anschließend wird ein zweites Mal mit 20 ccm Natriumbikarbonat 2 Min. geschüttelt.

Beim Ausschütteln mit Natriumbikarbonat tritt eine starke Gasentwicklung (Kohlendioxyd) auf. Ist diese so stark, daß die Flüssigkeit überzulaufen droht, muß sofort 25 ccm 1 n Natronlauge zugegeben werden. Darauf tritt in kurzer Zeit wieder eine Schichtentrennung ein. Die Natronlauge und Bicarbonatlösung wird wieder abgelassen und verworfen. Nachdem aus dem Ätherextrakt durch Waschung mit Natriumbicarbonat die sauren Bestandteile des Auszuges entfernt wurden, müssen noch die Stoffe mit phenolischen Hydroxylgruppen abgetrennt werden. Da diese alle in Natronlauge löslich sind, wird jetzt 2 Min. mit 25 ccm 1 n Natronlauge geschüttelt. Die sich rasch absetzende natronlaugehaltige Phase wird abgelassen und verworfen. Die Waschungen mit 20 ccm 1 n Natronlauge jeweils für 2 Min. werden noch zweimal wiederholt. Im Anschluß daran wird der Ätherauszug so oft mit 30 ccm destilliertem Wasser ausgewaschen, bis das nach jeder Waschung abgelassene Wasser neutral reagiert. Beim Ablassen des letzten Waschwassers ist darauf zu achten, daß kein Wasser im Ätherextrakt zurückbleibt, andererseits aber auch kein Äther mit verworfen wird. Daher ist es nötig, dem Gemisch genügend Zeit (ca. 5-10 Min.) zur Trennung zu geben. Um eine vollständige Trocknung zu erreichen, wird zum Ätherextrakt eine Spatelspitze geglühtes Natriumsulfat gegeben und anschließend filtriert.

ee) Abdestillieren des Extraktionsmittels

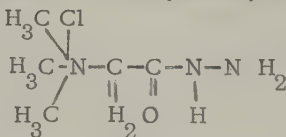
Der am Schluß zurückbleibende Ätherauszug wird quantitativ in einen 100 ccm fassenden Schlifffkolben überführt. Das Extraktionsmittel wird vollständig abdestil-

liert. Der im Kolben zurückbleibende, trockene Steroidrückstand wird jetzt der quantitativen Bestimmung der neutralen und alkoholischen 17-Ketosteroide mit m-Dinitrobenzol nach Zimmermann (57) zugeführt. Die Ausführung dieser Bestimmung ist im Kapitel III, B/4. beschrieben.

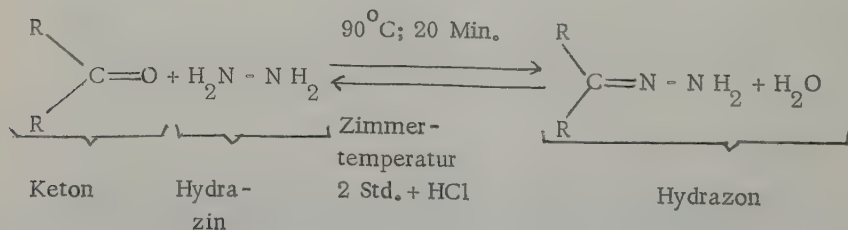
b) Bestimmung der gereinigten 17-Ketosteroide durch Aufspaltung in ketonische und nichtketonische Anteile nach der Girard - Methode

Bei der Anwendung dieser Methode wird der Harn genau so vorbehandelt und analysiert wie es im Kapitel zur Bestimmung der ungereinigten 17-Ketosteroide beschrieben wurde. Erst nach dem Abdestillieren des Extraktionsmittels beginnt die Aufspaltung in ketonische und nichtketonische Anteile nach der Analysenvorschrift von A b e l i n (1).

Das Verfahren von Girard und Sandulesco (8) hat den Zweck, störende Chromogene ohne Ketogruppen v. den neutralen Steroiden mit Ketogruppen am C-Atom 3, 17 oder 20 zu trennen. Durch das die Hydrazingruppe tragende Girard - Reagens T (Trimethylacetylhydrazidammoniumchlorid) mit folgender Konstitution



wird mit der jeweiligen Ketogruppe der neutralen Steroide in stark saurem Milieu und bei einer Temperatur von ungefähr 90°C ein wasserlösliches Hydrazon gebildet. Dieses Hydrazon kann durch Ausschütteln mit Äther von den in organischen Lösungsmitteln löslichen, aber wasserunlöslichen Substanzen abgetrennt werden. Eine sich daran anschließende Hydrolyse mit Salzsäure bei Zimmertemperatur spaltet die Hydrazone wieder nach folgender Reaktionsgleichung:



Nach der Hydrolyse können die neutralen, ketonischen Steroide, die durch die Hydrolyse in die freie, wasserunlösliche Form übergeführt worden sind, durch ein organisches Lösungsmittel (Äther) aus der wässrigen Phase extrahiert werden. Das dargelegte Prinzip wird durch die im folgenden geschilderten Arbeitsgänge verwirklicht:

aa) Reagentien

Eisessig

mit Methanol angeteigtes G i r a r d - Reagens T

10%ige Natronlauge p. A.

peroxydfreier Äther

2,5 %ige Natriumkarbonatlösung p. A.

bb) Umwandlung der ätherlöslichen Ketosteroide in wasserlösliche Hydrazone

Der im 100 ccm Schliffkolben zurückgebliebene, trockene Destillationsrückstand wird in 1 ccm Eisessig gelöst und mit einer Spatelspitze G i r a r d - Reagens T versetzt. Die Flüssigkeit wird bis zur Lösung der festen Partikelchen vorsichtig erwärmt. Dann wird der Schliffkolben für 20 Min. in ein Ölbad von 90° - 100°C verbracht. Ist diese Reaktionszeit verstrichen, wird zu der abgekühlten Lösung 15 ccm eiskaltes Wasser gegeben und sofort mit 10%iger Natronlauge neutralisiert. Hiernach wird die Lösung in einen 250 ccm fassenden Scheidetrichter überführt und 5 Minuten mit 20 ccm Äther zum Zwecke der Extraktion kräftig geschüttelt. Nachdem sich die Phasen getrennt haben, wird die unten befindliche, schwerere wässrige Phase in einen zweiten Scheidetrichter abgelassen und nochmal 5 Min. mit 20 ccm Äther geschüttelt. Nach dem erneuten Absetzen wird nun ein drittes Mal 5 Min. mit 20 ccm Äther geschüttelt. Die die Hydrazone der Ketosteroide enthaltende, wässrige Phase wird in ein Becherglas abgelassen, während man die drei Ätherauszüge in einem Scheidetrichter vereinigt. Dieser Ätherauszug wird, um eventuell noch in ihm vorhandene, wasserlösliche Hydrazone zu entfernen, zuerst mit 10 ccm eiskaltem Wasser, dann zweimal mit je 10 ccm 2,5%iger Natriumkarbonatlösung und dann dreimal mit 10 ccm destilliertem Wasser jeweils 2 Minuten ausgewaschen, wobei die schwerere Phase, also die Natriumkarbonatlösung jeweils in einem Becherglas gesammelt wird. Der Äther kann jetzt verworfen werden, da in ihm nur noch die nichtketonischen Anteile gelöst enthalten sind. Beim Ablassen der schwereren Phase aus dem Scheidetrichter ist darauf zu achten, daß kein Äther ausläuft, andererseits aber auch kein Wasser zurückbleibt.

cc) Spaltung der Hydrazone durch Hydrolyse

In das Becherglas, das die wässrige Phase mit den Hydrazonen enthält, werden 3 ccm konz. Salzsäure p. A. gegeben und zwei Stunden bei Zimmertemperatur stehengelassen. Durch Einwirkung der Salzsäure werden die Hydrazone gespalten und die ätherlöslichen Ketosteroide in Freiheit gesetzt.

Nach der zweistündigen Hydrolyse wird die wässrige Phase dreimal mit je 20 ccm Äther 5 Minuten lang geschüttelt, dabei werden die Ketosteroide vom organischen Lösungsmittel aufgenommen. Die wässrige Phase kann nach dieser dreimaligen Extraktion verworfen werden, während der Äther zur Entfernung aller wasserlöslichen Bestandteile noch einmal mit 10 ccm 2,5 %iger Natriumkarbonatlösung und dreimal mit je 10 ccm destilliertem Wasser jeweils für 2 Min. gewaschen wird. Auch hier ist darauf zu achten, daß beim Ablassen der wässrigen Rückstände eine vollständige Trennung zwischen den beiden Phasen erfolgt ist. Um eine Trocknung zu erreichen, kann zum Ätherauszug eine Spatelspitze geglühtes Na_2SO_4 gegeben und anschließend filtriert werden.

dd) Abdestillieren des Extraktionsmittels

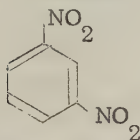
Nach der Waschung des Äthers wird dieser in einen 100 ccm fassenden Schliffkolben gebracht und vollkommen abgedampft. Das im Kolben verbleibende Steroidprodukt bildet einen fast farblosen Rückstand. Im Anschluß an diese Trocknung erfolgt die quantitative Messung der neutralen 17-Ketosteroide in derselben Weise, wie sie bei den ungereinigten 17-Ketosteroiden vorgenommen wird.

4. Messung des Harnrückstandes mit Hilfe der m-Dinitrobenzolreaktion nach Zimmermann (57)

Die nach dem oben beschriebenen Verfahren aufgearbeiteten Harnproben können jetzt nach der m-Dinitrobenzolreaktion nach Zimmermann (57) quantitativ bestimmt werden, da nach dieser Methode alle ätherlöslichen, neutralen, ketogruppentragenden Verbindungen erfaßt sind.

Die colorimetrische Messung der neutralen 17-Ketosteroide wird im Prinzip da-

durch ermöglicht, daß m-Dinitrobenzol



in alkalischem Milieu mit ketogruppenhaltigen

Steroidhormonen eine violette Farbe gibt. Der Reaktionsmechanismus hierfür ist jedoch noch nicht geklärt. Zur Durchführung der Bestimmung werden zu dem in Alkohol gelösten Harnextrakt gleiche Mengen von Kalilauge und alkoholischer m-Dinitrobenzollösung gegeben. Parallel mit dieser Probe wird ein Blindwert angesetzt, in dem statt der Hormonlösung reiner, unvergällter Alkohol verwendet wird. Diese Proben werden dann nach einer bestimmten, festgesetzten Reaktionszeit gegeneinander colorimetrisch gemessen.

Zur Ausführung dieser Messung werden folgende Reagentien benötigt:

- 2 %ige alkoholische m-Dinitrobenzollösung, die wöchentlich aus 1 g m-Dinitrobenzol p. A. und 50 ccm absolutem unvergällten Alkohol hergestellt werden muß;
- absoluter, unvergällter Äthylalkohol;
- 3 n Kalilauge.

Der im Schliffkolben vorhandene, trockene Steroidrückstand wird in 5 ccm absolutem, unvergällten Alkohol vollständig gelöst. Es ist nun ein Konzentrationsverhältnis von 1:10 erreicht, da von 50 ccm Harn ausgegangen wurde. Um das vollständige Auflösen der Steroide im Alkohol zu erleichtern, kann man die Lösung kurz erwärmen.

Anschließend muß die Lösung wieder abgekühlt werden bis weißliche Flocken ausfallen. Diese werden, um Störungen bei den folgenden Reaktionen zu vermeiden, durch Filter S & S Nr. 595 abfiltriert.

In zwei bereitgestellte Reagenzgläser werden genau je 1 ccm aus der jetzt klaren Flüssigkeit einpipettiert. In einem dritten Reagenzglas wird statt der alkoholischen Hormonlösung 1 ccm reiner Alkohol einpipettiert. In alle drei Reagenzgläser werden dann je 1 ccm 2%ige m-Dinitrobenzollösung und 1 ccm 3 n KOH hinzugegeben. Daran anschließend werden die Gläser geschüttelt, verstöpselt und bei 25°C in einen abgedunkelten Thermostaten gebracht, wo sie 55 Minuten verbleiben.

Nach dieser Zeit gibt man in jedes Reagenzglas 6 ccm Äther, schüttelt und filtriert durch Filter S & S Nr. 595; dabei setzen sich unerwünschte, ggf. noch vorhandene Chromogene ab. Nach weiteren 5 Minuten - vom Entnehmen aus dem Thermostaten an gerechnet - wird im elektrischen Photometer (Zeiß ELKO II) bei Filter S 49 und $d = 1$ cm photometriert. Als Kontrolle wird anschließend die zweite Hormonprobe gemessen.

Mit dem v. ELKO abgelesenen Extinktionswert kann auf der Eichkurve die in mg 17-Ketosteroide/ltr. Harn ausgedrückte Konzentration abgelesen werden. Durch Multiplikation dieses Wertes mit dem ausgeschiedenen Harn können die mg 17-Ketosteroide/Portion errechnet werden. Es ist darauf zu achten, daß die Reaktionszeiten vom Verbringen in den Thermostaten an eingehalten werden, da die Farbentwicklung in den Hormonproben zeitabhängig ist.

5. Feststellung des Filterschwerpunktes

Bei der Feststellung des Filterschwerpunktes ist der Filter zu ermitteln, bei dem die Lichtabsorption am größten ist. Dieser wird in der Weise ermittelt, daß eine Hormonprobe mit sämtlichen Filtern photometriert wird. Der Filter derjenigen Wellenlänge, die den höchsten Extinktionswert ergibt, wird für alle weiteren Messungen verwendet. Bei diesen Versuchen zeigten die Filter S 49 und S 50 die stärksten Absorptionen.

6. Anfertigen der Eichkurve

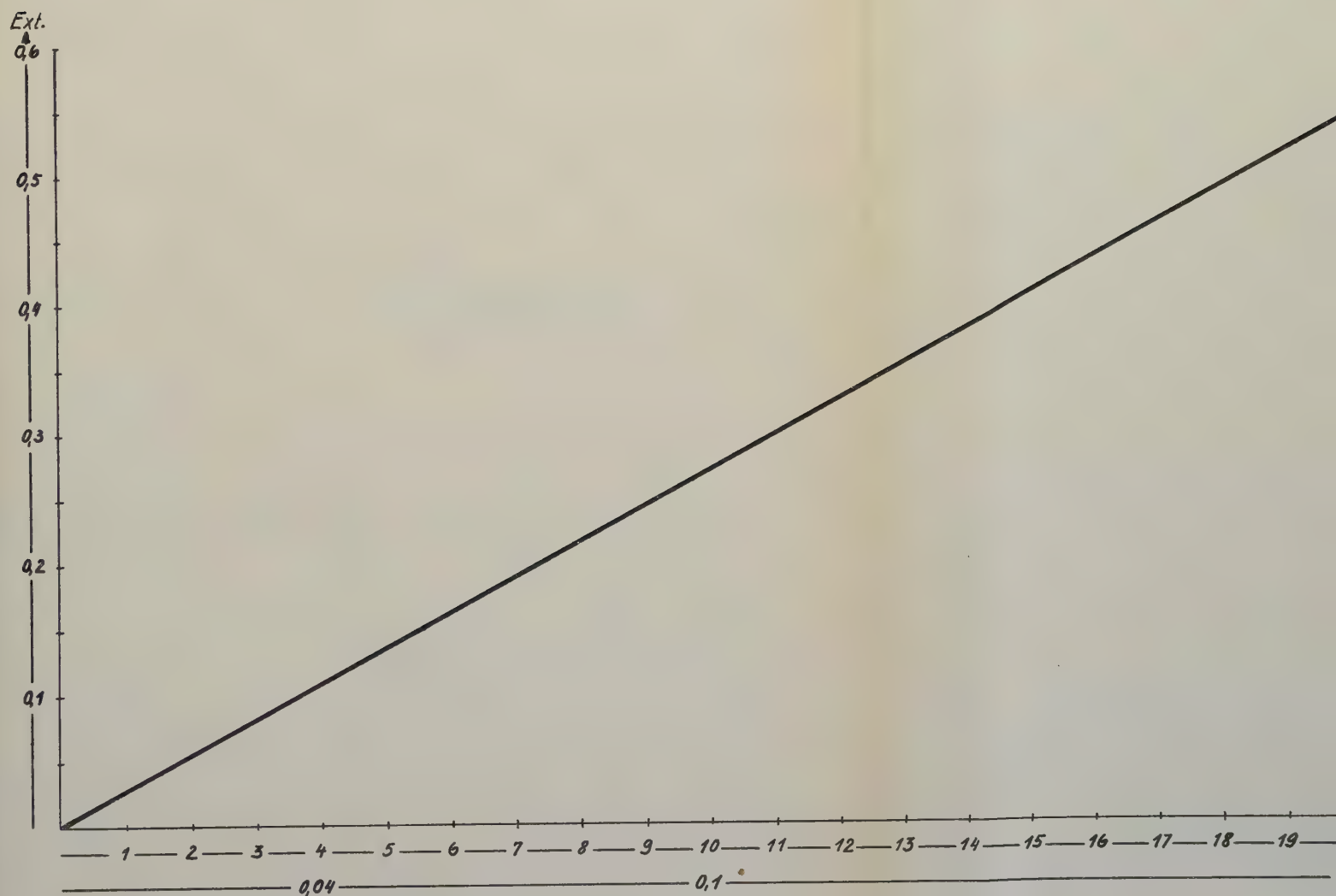
Die Eichkurve dient zur Umrechnung der bei der colorimetrischen Messung erhaltenen Extinktionswerte in mg 17-Ketosteroide/Liter Harn.

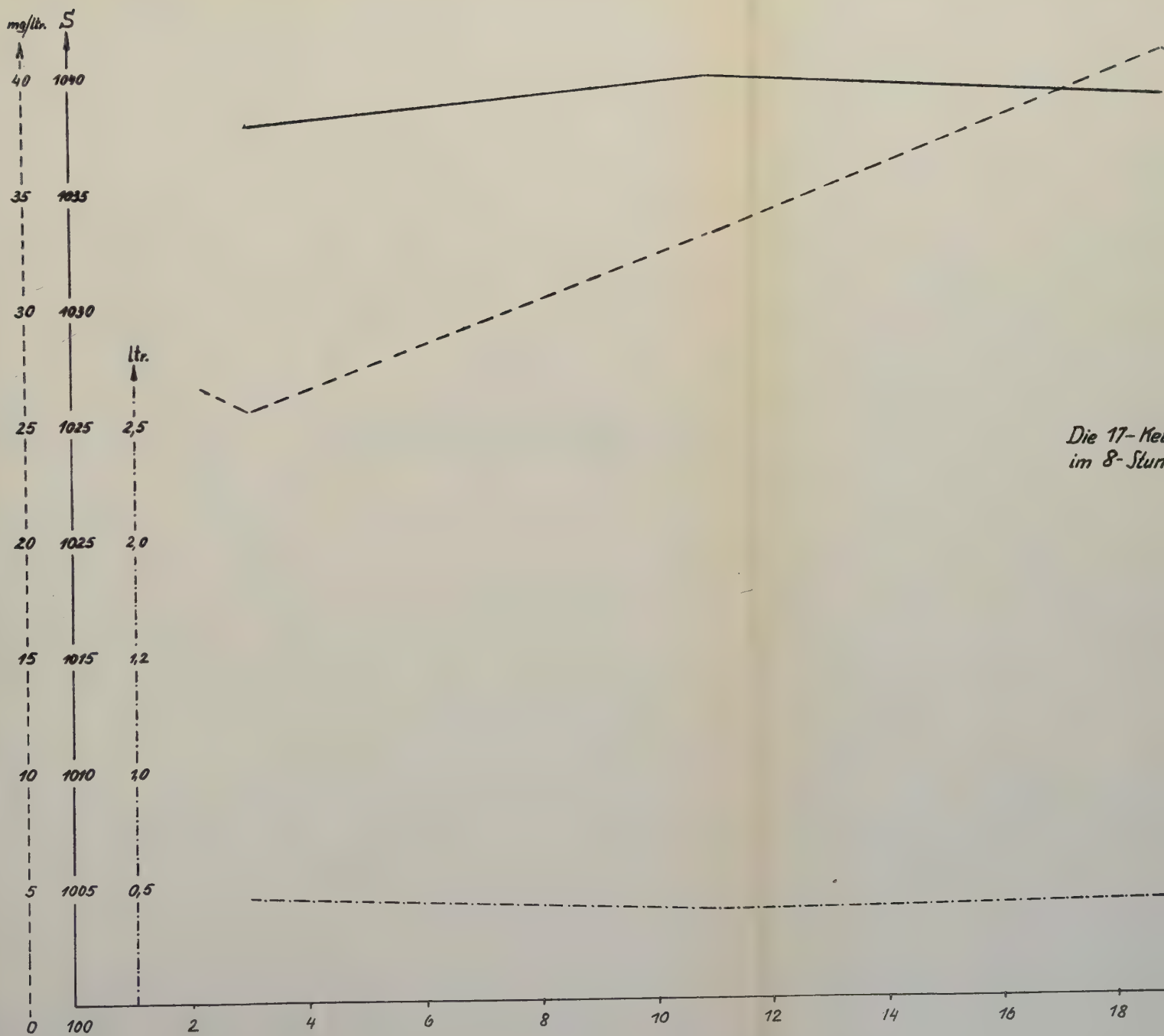
Als Eichsubstanz verwendeten wir reines kristallines Androsteron. 10,0 mg Androsteron wurden in 10 ccm absolutem, unvergällten Äthylalkohol gelöst. Mit dieser Lösung wurden folgende Konzentrationen hergestellt.

0.04 mg Androsteron	pro	1 ccm Alkohol
0.10 mg	"	" 1 " "
0.20 mg	"	" 1 " "

Zum Anfertigen der Eichkurve für die ungereinigten 17-Ketosteroide wurde von

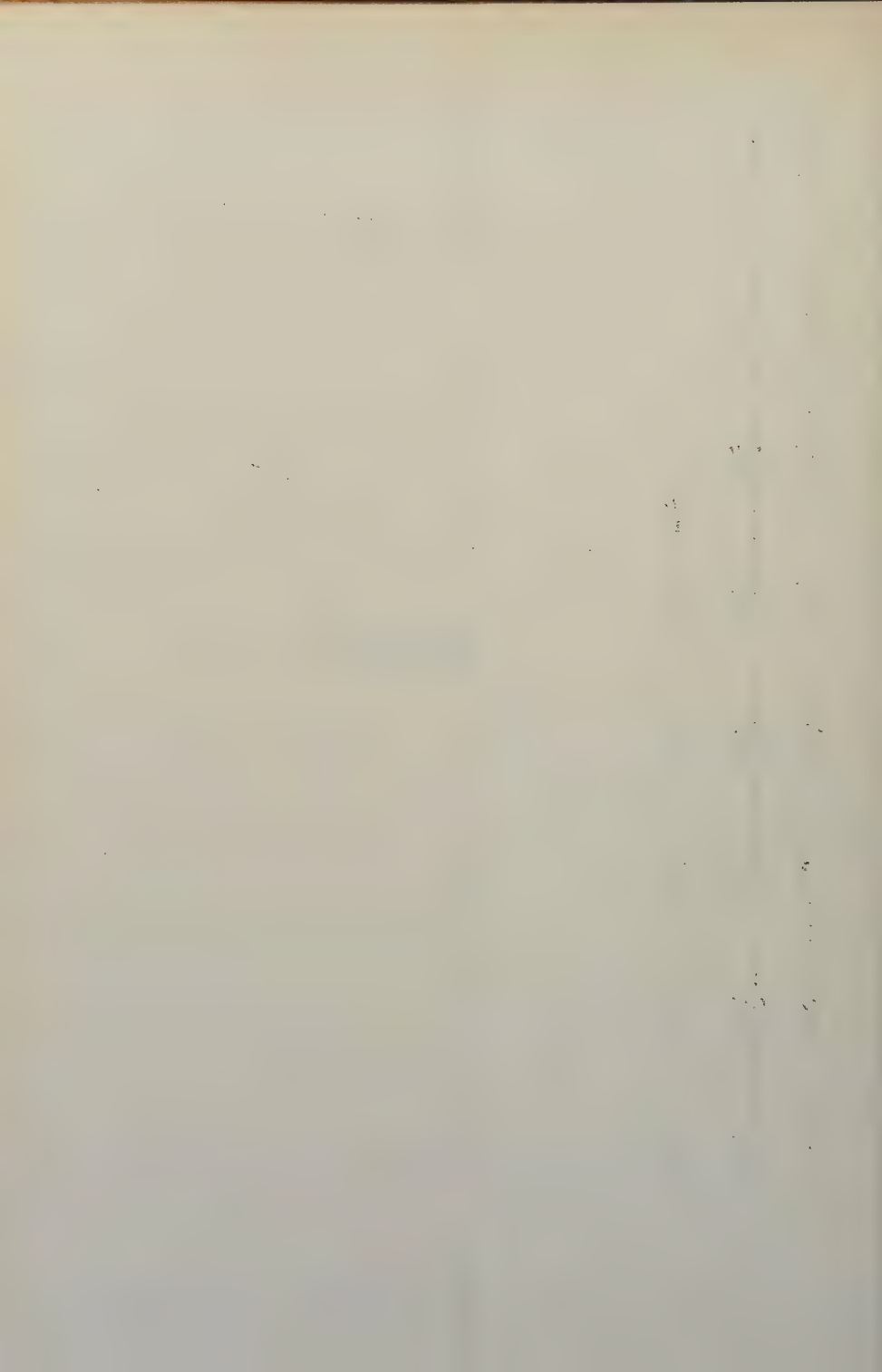
*Eichkurve zur Bestimmung der ungereinigten 17-Ketosteroide
bei Filter $S: 49$; $d = 1\text{ cm}$*





Die 17-Ke
im 8-Stun

Abb. 1



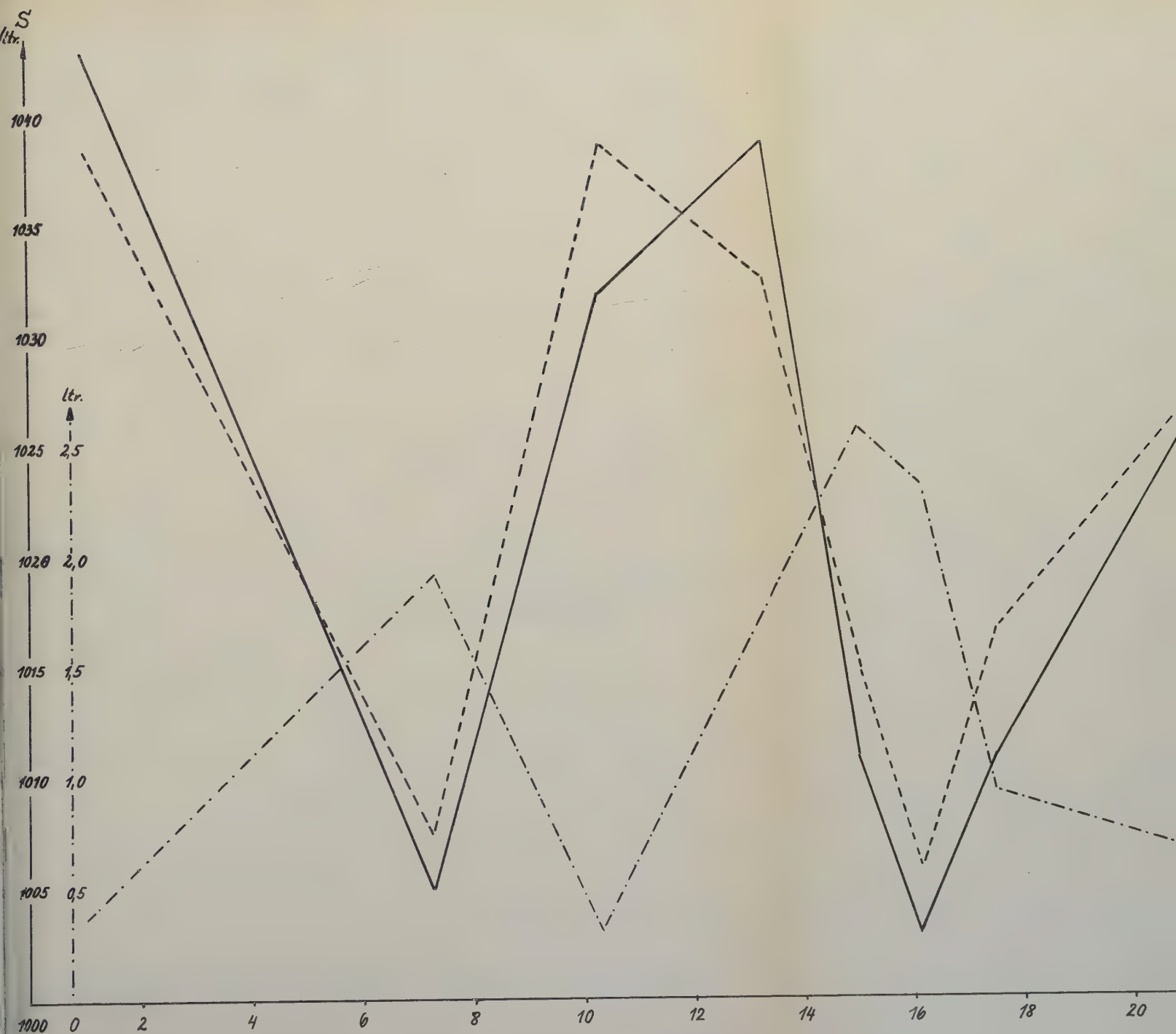


Abb. 2

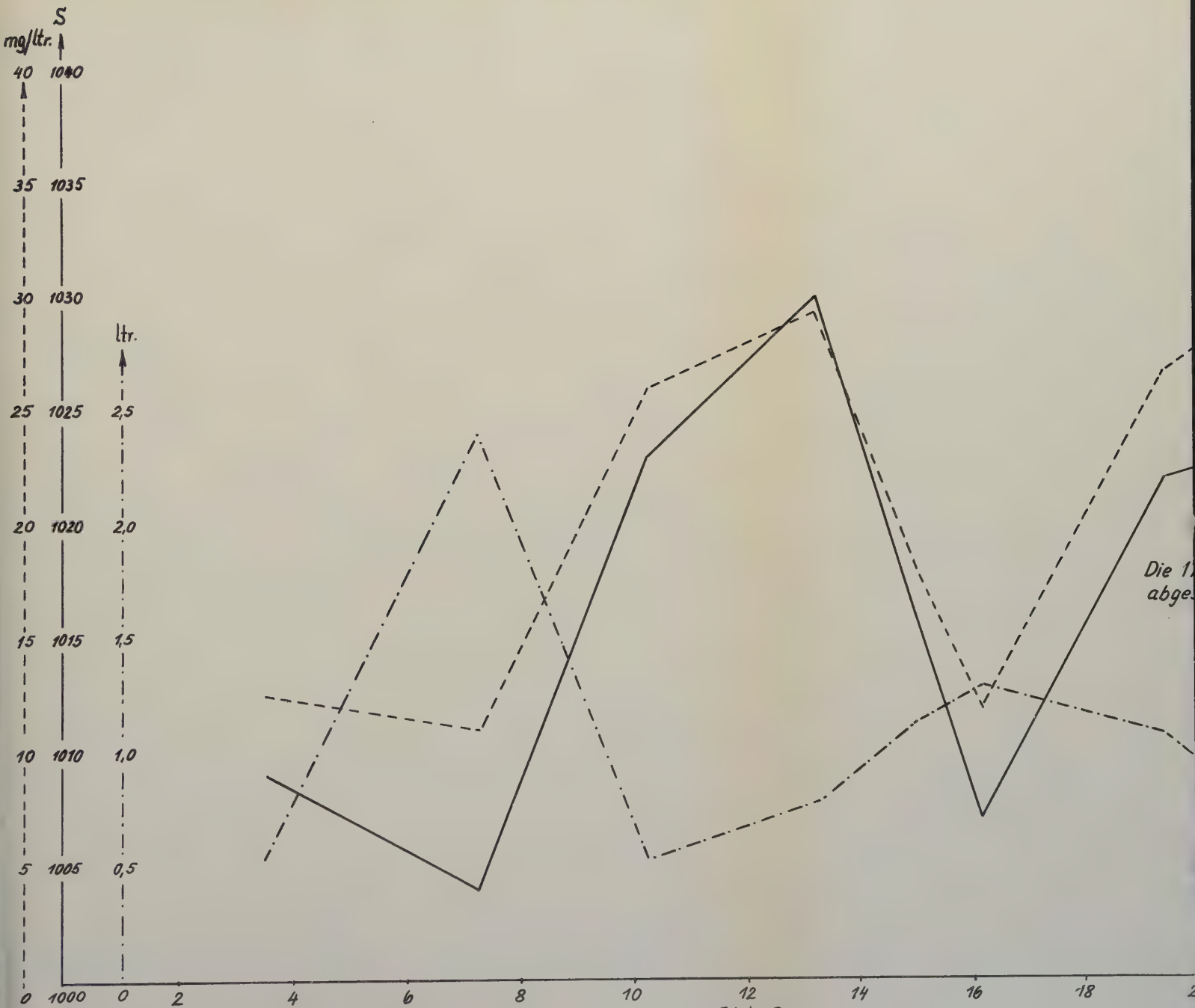


Abb. 3

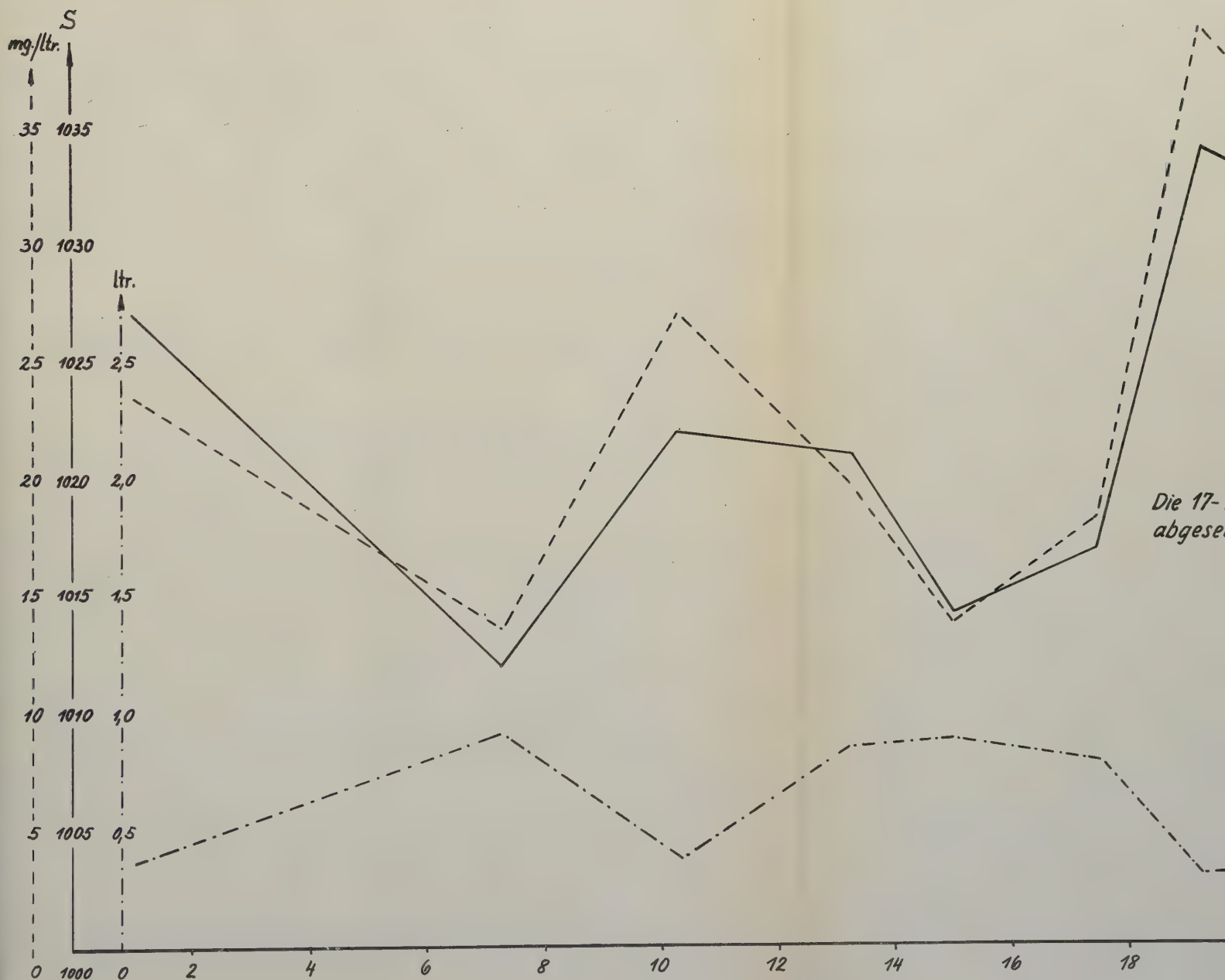


Abb. 4

jeder Konzentration 1 ccm (gleich einer Ausgangsmenge von 10 ccm Harn) zur Reaktion gebracht. Die ermittelten

Extinktionen	von 0,110	0,275	0,550	entsprechen
Konzentrationen	" 0,04	0,10	0,20	Androsteron.

Diese Steroidkonzentrationen müssen nach der angewandten Methodik von 10 ccm Ausgangslösung auf 1 Ltr. Lösung bezogen werden. So bedeutete also die Extinktion von

0,110 =	4 mg Androsteron / 1 Ltr. Lösung
0,275 =	10 mg " " "
0,550 =	20 mg " " "

Diese Werte ergeben graphisch dargestellt eine Gerade, die durch den 0-Punkt läuft.

Die Eichkurve für die gereinigten 17-Ketosteroide muß dieselbe sein, wie die der ungereinigten, da die ursprünglichen Androsteronkonzentrationen auch nach der Reinigung noch vorhanden sein müssen. Es wäre denkbar, daß durch den längeren Reinigungsvorgang Verluste auftreten.

Beim Anfertigen der Eichkurve für die mit G i r a r d - Reagens T gereinigten 17-Ketosteroide geht man von denselben Hormonkonzentrationen aus, wie sie bei den ungereinigten verwendet werden. Der Alkohol wird abgedampft und der zurückbleibende Androsteronrückstand wird wie bei der oben beschriebenen Arbeitsvorschrift für die gereinigten Ketosteroide in Eisessig gelöst und weiterverarbeitet. Nach dem Abdampfen des Äthers wird der Steroidrückstand in 3 ccm Alkohol gelöst und 1 ccm dieser Lösung zur m-Dinitrobenzolreaktion angesetzt. Es ist also jetzt nur der dritte Teil der ursprünglichen Androsteronkonzentration zur Reaktion gelangt, was hernach beim Ablesen der Extinktionswerte am ELKO zu berücksichtigen ist. So ergab sich als

abgeles. Extinkt.	0,037	umgerechn. Ext.	0,111	entspr.	4 mg Andr. / 1
"	"	0,090	"	"	0,270 " 10 mg " Ltr. Lös.
"	"	0,180	"	"	0,540 " 20 mg " "

Auf diese Weise wurden für die Eichkurve folgende Werte ermittelt:

Ausgangs- konzentr. i. mg Andr.	<u>Ungereinigte 17-Ketosteroide</u>			<u>gereinigte 17-Ketosteroide</u>		
	abgeles. Ext.	mg Andr.	/1 Ltr. Lös.	abgeles. Ext.	umgerech- nete Ext.	mg Andr. 1 Ltr. Lös.
0,04	0,110		4	0,037	0,111	4
0,10	0,275		10	0,090	0,27	10
0,20	0,55		20	0,180	0,540	20

Der Vergleich beider Eichkurven zeigt, daß bei den mit dem G i r a r d - Reagens T gereinigten 17-Ketosteroiden eine geringgradige Differenz von 2% auftritt, die auf Verluste zurückgeführt werden, die durch den Trennungsgang eintreten.

IV. ERGEBNISSE

In Tabelle 1 sind sämtliche Untersuchungsergebnisse der sechs Jungrinder aufgeführt. Bei den einzelnen Werten ist am Rande durch ein Kreuz (+) vermerkt, falls sie auf unvollständigen Harnportionen beruhen oder das Tier künstlichen Belastungen unterworfen war. Diese Werte wurden bei der Errechnung von Durchschnittswerten nicht berücksichtigt. Die mittlere Abweichung vom Mittelwert wurde nach folgender Formel errechnet:

$$m = \pm \sqrt{\frac{\sum a^2}{n-1}},$$

wobei a = die Abweichung vom Mittelwert,
 n = die Gesamtzahl der Einzelwerte und
 $\sum$ = das Zeichen der Addition ist.

Tabelle 1

Nr.	Menge in Ltr.	spez. Gew.	unger.17-Ketost. mg/Ltr.	mg/Tag	gereinigte mg/Ltr.	17-Ketost. mg/Tag
<u>Jungrind I</u>						
1.	2,1	1030	9,8	20,6	3,4	7,14
2.	8,24	1010	3,5	28,8	0,9	7,41
3.	8,1	1009	4,9	39,7	1,2	9,72
4.	2,44	1013	10,5	25,6	3,5	8,55
5.	6,99	1009	5,6	39,1	1,6	11,19 +
6.	4,29	1010	6,6	28,25	2,1	9,0
7.	9,61	1005	5,4	51,9	2,2	21,2
8.	4,46	1010	9,2	41,1	3,6	16,08
<u>Jungrind II</u>						
1.	1,76	1056	23,5	41,4	8,1	14,25
2.	1,81	1051	25,3	45,75	8,8	15,92
3.	1,88	1052	25,7	48,4	8,9	16,74
4.	2,38	1043	21,8	51,9	7,8	18,8
5.	3,42	1029	14,4	44,2	5,3	18,15

Nr.	Menge in Ltr.	spez. Gew.	unger. 17-Ketost.		gereinigte 17-Ketost.	
			mg/Ltr.	mg/Tag	mg/Ltr.	mg/Tag

Jungrind III

1.	1,64	1041	26,2	43,0	5,1	9,67 +
2.	1,93	1041	20,75	40,1	8,5	16,4
3.	1,12	1044	22,1	24,75	8,9	9,96 +
4.	1,45	1048	27,8	40,4	10,5	15,23
5.	1,38	1049	27,7	38,2	9,3	12,83

Jungrind IV

1.	2,83	1030	16,1	45,5	2,0	5,66
2.	2,33	1029	22,2	51,7	8,5	19,8
3.	2,54	1037	24,6	62,5	10,9	27,7
4.	2,2	1044	28,4	62,5	11,05	24,3

Jungrind V

1.	3,54	1035	24,0	85,0	9,8	34,7
2.	2,96	1042	25,8	71,4	10,0	29,6
3.	2,91	1038	28,4	82,6	10,5	30,59
4.	2,73	1041	27,7	75,6	9,9	27,0

Jungrind VI

1.	2,37	1051	25,9	61,4	8,2	19,4
2.	2,18	1048	27,1	59,1	8,8	19,2
3.	2,31	1042	25,1	57,9	11,4	26,3
4.	2,59	1042	26,8	69,4	10,9	28,25
5.	2,39	1043	25,7	61,4	10,0	23,9

Tabelle 2

Mittelwerte und mittlere Abweichung der einzelnen Jung-
rinder

	unger. 17-Ketost. mg/Tag	gereinigte 17-Ketost. mg/Tag
Jungrind I	34,7 $\pm$ 10,6	11,3 $\pm$ 4,9
Jungrind II	47,56 $\pm$ 3,36	17,4 $\pm$ 1,29
Jungrind III	39,57 $\pm$ 1,2	14,82 $\pm$ 1,82
Jungrind IV	58,8 $\pm$ 6,25	23,9 $\pm$ 3,96
Jungrind V	78,65 $\pm$ 6,26	30,47 $\pm$ 3,2
Jungrind VI	61,85 $\pm$ 4,4	23,41 $\pm$ 4,02

	mg/Ltr.		mg/Ltr.	
Jungrind I	6,2 $\pm$	2,24	2,1 $\pm$	0,99
Jungrind II	21,8 $\pm$	5,23	7,7 $\pm$	1,68
Jungrind III	25,4 $\pm$	4,0	9,4 $\pm$	1,0
Jungrind IV	25,1 $\pm$	3,12	10,2 $\pm$	1,45
Jungrind V	26,5 $\pm$	1,98	10,0 $\pm$	0,36
Jungrind VI	26,1 $\pm$	0,82	9,9 $\pm$	1,36

Tabelle 3

Mittelwerte und mittlere Abweichung der 4- und 5-mona-
tigen Jungrinder

	unger. 17-Ketost. mg/Tag	gereinigte 17-Ketost. mg/Tag
3 viermonat. Jungrinder	42,4 $\pm$ 4,47	15,53 $\pm$ 1,63
3 fünfmonat. Jungrinder	66,47 $\pm$ 10,6	25,93 $\pm$ 3,94

	mg/Ltr.		mg/Ltr.	
3 viermonat. Jungrinder	17,8 $\pm$	10,2	6,4 $\pm$	3,82
3 fünfmonat. Jungrinder	25,9 $\pm$	0,72	10,0 $\pm$	0,016

In Tabelle 4 sind sämtliche Untersuchungsergebnisse der untersuchten Bullen aufgeführt. Bei den Einzelwerten ist durch ein Kreuz (+) vermerkt, daß an diesem Tag die Besamungsbullen zur Ejakulation gebracht worden sind. Es hat sich gezeigt, daß hierdurch gelegentlich der folgende Ketosteroidwert erhöht sein kann. In solchen Fällen ist dieser zur Errechnung der Durchschnittswerte und damit zur Errechnung der Standardabweichung nicht herangezogen worden.

Tabelle 4

Nr.	Menge in Ltr.	spez. Gew.	unger. 17-Ketost.		gereinigte 17-Ketost.	
			mg/Ltr.	mg/Tag	mg/Ltr.	mg/Tag
<u>Bulle A</u>						
1. Tag	8,4	1033	-	-	8,0	67,2
2. Tag	9,6	1032	-	-	7,3	70,1 +
3. Tag	10,5	1031	20,3	213	8,0	84
4. Tag	8,3	1031	-	-	9,1	75,5
5. Tag	7,34	1035	15,2	111,2	9,5	69,6
6. Tag	3,62	1037	-	-	9,9	35,8
7. Tag	4,9	1040	39,2	192,1	8,9	43,6 +
<u>Bulle B</u>						
1. Tag	3,29	1027	26,0	85,6	11,9	39,2
2. Tag	6,11	1025	23,7	145	9,4	57,4 +
3. Tag	7,38	1016	18,1	133,5	7,8	57,5
4. Tag	7,31	1028	28,6	209,5	11,6	84,8
<u>Bulle C</u>						
9h -17h	2,15	1044	31,9	65,3	11,7	24,65
17h - 8h	5,1	1043	28,8	147	11,3	57,6
1. Tag	9,71	1040	26,3	255,9	11,3	109,9
2. Tag	12,25	1038	25,5	312	11,2	137,1 +
3. Tag	7,05	1041	30,1	212	12,2	86
10h -15h	2,42	1049	27,4	26,5	-	- +
15h -23h	1,46	1042	32,0	46,7	-	-
23h - 7h	4,81	1040	27,3	131,2	-	-

Menge in Ltr.	spez. Gew.	unger. 17-Ketost.		gereinigte 17-Ketost.	
		mg/Ltr.	mg/Port.	mg/Ltr.	mg/Port.

Bulle C Fortsetzung!

7h -15h	3,14	1038	29,2	91,7	-	-
15h -23h	2,74	1040	33,6	92,1	-	-
23h - 7h	4,54	1039	24,3	110,3	-	-
7h -15h	3,1	1040	33,7	103,1	-	-
15h -23h	3,47	1039	41,0	142	-	-
23h - 7h	3,53	1038	25,7	90,7	-	-
7h -15h	4,58	1038	36,6	167,5	-	-
15h -23h	5,24	1036	28,4	148,5	-	-
23h - 7h	4,23	1037	20,7	87,6	-	-
7h -15h	1,97	1040	25,0	49,3	-	-

Bulle D 1. Versuchsperiode

1. Tag	5,36	1037	32,2	172,5	10,9	58,5 +
2. Tag	5,89	1041	34,4	202	11,0	64,8
3. Tag	5,47	1037	29,5	161,2	9,2	50,3
4. Tag	6,8	1023	21,3	145	8,0	54,4
5. Tag	5,52	1037	32,0	176,5	13,2	72,9
8h-15h	2,1	1030	18,3	38,4	-	- +
15h-23h	1,1	1034	29,5	32,5	-	-
23h- 7h	2,55	1036	30,8	78,5	-	-
7h-15h	2,55	1037	38,2	86	-	-
15h-23h	2,17	1038	35,2	76,4	-	-
23h- 7h	3,04	1035	29,8	90,6	-	-
7h-15h	2,42	1037	37,4	90,5	-	-
15h-24h	2,09	1037	55,4	115,5	-	-
0h- 7h	2,34	1035	30,4	71,2	-	-
8h-15h	1,55	1043	32,0	49,6	-	-
15h-23h	2,4	1041	30,0	72	-	-
23h- 8h	3,52	1033	25	88,5	-	-
8h-16h	2,44	1032	25,5	62,3	-	- +
16h-24h	1,24	1037	34,4	42,6	-	-
0h- 8h	3,53	1037	25,6	90,4	-	-
17.45 h	0,6	1039	38,5	23,1	-	-

	Menge in Ltr.	spez. Gew.	unger. 17-Ketost. mg/Ltr.	gereinigte 17-Ketost. mg/Ltr.	mg/Port.	mg/Port.
--	------------------	------------	------------------------------	----------------------------------	----------	----------

Bulle D Fortsetzung!

22h- 7h	3,73	1037	35,9	134	-	-
7.30h-						
8.30h	0,95	1036	31,4	29,8	-	-
12,30h	1,26	1039	36,8	46,4	-	-
13h-15h	0,54	1037	28,2	15,2	-	-
15h-17h	0,58	1033	24,2	14,05	-	-
17h-19h	1,22	1038	36,1	44,1	-	-

Bulle D 2. Versuchsperiode

20h-6h	3,75	1043	38,6	144,5	-	-
6h-						
8.30h	4,84	1005	7,7	37,2	-	-
8.30h-						
12h	1,1	1032	38,9	42,8	-	-
12h-						
14,30h	1,12	1039	32,8	36,7	-	-
14,30h-						
15,30h	2,59	1011	14,9	38,6	-	-
15,30h-						
16,45h	2,93	1003	6,1	17,9	-	-
16,45h-						
18,15h	1,4	1011	16,9	23,7	-	-
18,15h-						
20,15h	1,46	1043	45,4	66,3	-	-
20,15h-						
6h	2,65	1047	38,8	103	-	-
6h-						
8.30h	1,68	1016	17,3	29,1	-	-
8.30h-						
12h	0,89	1033	46,2	41,1	-	-
12h-						
14,30h	2,42	1032	34,8	84,2	-	-

	Menge in Ltr.	spez. Gew.	unger. 17-Ketost. mg/Ltr.	mg/Port.	gereinigte 17-Ketost. mg/Ltr.	mg/ort.
--	------------------	------------	------------------------------	----------	----------------------------------	---------

Bulle D 2. Versuchsperiode

14,30h-						
15,30h	1,24	1010	11,5	14,25	-	-
16,45h-						
18,15h	1,09	1015	20,1	22,9	-	-

Bulle E 1. Versuchsperiode

1. Tag	7,98	1031	27,8	222	11,1	88,5
2. Tag	5,48	1040	31	169,9	12,2	66,9
3. Tag	3,56	1042	32,4	115,2	11,9	42,4 +
4. Tag	6,63	1024	22,4	148,5	8,3	55,0
11h-13h	0,88	1041	39,2	34,5	-	-
14h-14.30	0,76	1038	29,1	22,1	-	-
14,30h-						
16h	0,32	1037	28	8,95	-	-
6h-18h	0,61	1038	24,0	14,65	-	-
18h-19h	0,63	1038	30,1	18,97	-	-
19h-21h	0,65	1035	31,5	20,5	-	-
21h-						
1,30h	1,33	1032	27	35,9	-	-
1.30h-						
9h	3,24	1027	20,6	66,7	-	-
12h-15h	1,12	1034	26,2	29,3	-	-
15h-19h	1,2	1036	27,7	33,2	-	-
19h-23h	0,77	1032	29,9	23,0	-	-
23h-						
5,45h	2,95	1032	23,6	69,6	-	-

Bulle E 2. Versuchsperiode

14,30h-						
15,30h	2,25	1007	9,7	21,8	-	- +
15,30h-						
16,45h	0,73	1004	10,9	7,96	-	-

	Menge in Ltr.	spez. Gew.	unger. 17-Ketost. mg/Ltr.	mg/Port.	gereinigte 17-Ketost. mg/Ltr.	mg/Port.
--	------------------	------------	------------------------------	----------	----------------------------------	----------

Bulle E 2. Versuchsperiode Fortsetzung!

16.45h-						
18.15h	2,0	1014	18,1	36,2	-	-
18.16h-						
20.15h	1,79	1019	22,2	39,8	-	-
22h- 6h	5,49	1022	23,2	127,5	-	-
6h-8.30h	4,48	1004	10,0	44,8	-	-
8.30h-						
12h	3,39	1011	17,7	60,0	-	-
12h-						
14.30h	1,85	1022	24,3	45,0	-	-
6h.8.30h	5,95	1004	11,0	64,9	-	-
8.30h-						
12h	1,84	1023	26,1	48,1	-	-
12h-						
14.30h	1,95	1030	29,8	58,2	-	-
14.30h-						
15.30h	1,12	1016	18,0	20,2	-	-
15.30h-						
16.45h	1,6	1007	12,0	19,2	-	-
18.30h-						
20.15h	1,89	1022	26,8	50,6	-	-
22h-1h	0,74	1025	34	25,2	-	-
1h-6h	2,7	1009	12,5	33,8	-	-

Bulle F

18.15h-						
20.15h	0,59	1034	39,2	23,1	-	-
20.15h-						
6h	3,58	1027	23,6	84,5	-	-
6h-8.30h	2,27	1012	13,4	30,4	-	-
8.30h-						
12h	1,36	1022	27,0	36,7	-	-
12h-						
14.30h	2,1	1021	19,8	41,6	-	-

	Menge in Ltr.	spez. Gew.	unger. 17-Ketost.		gereinigte 17-Ketost.	
			mg/Ltr.	mg/Port.	mg/Ltr.	mg/Port.
Bulle F	Fortsetzung!					
14,30h-						
15,30h	0,88	1014	13,9	12,2	-	-
16,45h-						
18,15h	1,18	1017	18,25	21,5	-	-
18,15h-						
10,15h	0,51	1038	46,9	23,9	-	-
20,15h-						
6h	3,27	1032	28,8	94,2	-	-
6h-8.30h	1,32	1016	15,4	20,3	-	-
8.30h-						
12h	0,65	1030	43,3	28,2	-	-
12h-						
14,30h	1,64	1035	37,4	61,3	-	-
14,30h-						
15,30h	0,45	1037	33,6	15,1	-	-
16,45h-						
18,45h	0,81	1036	44,4	35,9	-	-
20,15h-						
6h	3,92	1029	23,95	94,0	-	-
6h-8.30h	1,84	1014	18,4	33,9	-	-
8.30h-						
12h	1,32	1029	35	46,2	-	-
12h-						
14,30h	1,1	1037	28	30,8	-	-
15,30h-						
16,45h	0,84	1026	19,45	16,35	-	-
16,45h-						
18,15h	0,37	1037	49,2	18,1	-	-
20,15h-						
6h	3,25	1038	42,6	138,5	-	-
6h-7,15h	1,31	1031	34,4	45,1	-	-
7,15h-8h	0,77	1023	23,0	17,7	-	-
8h-12h	0,67	1036	44,8	30,0	-	-

	Menge in Ltr.	spez. Gew.	unger. 17-Ketost.		gereinigte 17-Ketost.	
			mg/Ltr.	mg/Port.	mg/Ltr.	mg/Port.
<u>Bulle F</u> Fortsetzung!						
12h-						
14, 30h	2,11	1027	28,0	59,5	-	-
14, 30h-						
15, 30h	0,65	1017	18,1	11,75	-	-
16, 45h-						
18, 15h	1,09	1021	21,3	23,2	-	-
1. Tag	9,61	1031	30,6	294,0	11,2	107,5
2. Tag	11,59	1026	28,2	326,0	11,3	131,0
3. Tag	9,71	1031	36,1	351,0	13,0	126,5

Tabelle 5

Mittelwerte und mittlere Abweichung der einzelnen Bullen

	unger. 17-Ketost.		gereinigte 17-Ketost.	
	mg/Tg.		mg/Tg.	
Bulle A	162,1 [±]	72,0	74,08 [±]	20,2
Bulle B	171,5 [±]	53,6	71,15 [±]	19,6
Bulle C	344,5 [±]	55,2	-	-
Bulle D	179,9 [±]	20,6	62,67 [±]	11,5
Bulle E	180,1 [±]	37,8	70,1 [±]	17,0
Bulle F	323,27 [±]	28,6	121,67 [±]	12,4
	unger. 17-Ketost.		gereinigte 17-Ketost.	
Bulle A	17,7 [±]	3,6	8,9 [±]	0,87
Bulle B	23,4 [±]	7,1	9,7 [±]	2,68
Bulle C	30,3 [±]	6,4	-	-
Bulle D	31,9 [±]	2,46	11,1 [±]	2,0
Bulle E	28,4 [±]	4,65	10,9 [±]	2,06
Bulle F	31,6 [±]	4,05	11,8 [±]	1,01

Tabelle 6

Mittelwerte und mittlere Abweichung der sechs Bullen

mg/Tg.	mg/Tg.
225,9 $\pm$ 83,5	79,93 $\pm$ 23,8
mg/Ltr.	mg/Ltr.
27,2 $\pm$ 5,6	10,5 $\pm$ 1,16

Nachfolgend sind diejenigen Werte der Bullen C, D, E und F (Abb. 1, 2, 3, 4) graphisch dargestellt, die in Einzelportionen zu verschiedenen Tageszeiten analysiert worden sind. Die Wiedergabe der Werte, ausgedrückt in mg/Ltr., bezogen auf ein spezifisches Gewicht von 1030 und diejenigen in mg/Std., sind nicht zur Darstellung gekommen, weil diese Werte zwischen den einzelnen Tieren und auf Grund der wiederholten Tagesmessungen keine reproduzierbaren Werte gebracht haben.

V. DISKUSSION DER ERGEBNISSE

In der vorliegenden Arbeit sind ebenso wie bei S t o c k (47) teilweise nach zwei verschiedenen Verfahren die neutralen 17-Ketosteroide bestimmt worden. Bei der nach G i r a r d vorgeschlagenen Reinigung dieser Fraktion, bei welcher auf Grund der Hydrazonbildung nur solche Verbindungen erfaßt werden, die Ketogruppen enthalten, hat sich gezeigt, daß sich hierdurch absolut gesehen ein kleinerer Zahlenwert ergibt, der in der Proportion mg/Ltr. im Durchschnitt bei den Bullen in bezug zu den ungereinigten 17-Ketosteroiden bei 1:2,56 liegt. Dies bedeutet, daß bei dieser Art der Bestimmung der 17-Ketosteroide nach Z i m m e r m a n n (57) etwa 2/3 andere Stoffe als Ketosteroide bei dem normalen Reinigungsgang noch mitreagieren. Dieser Befund ist für Rinder erstmals von S t o c k (47) beschrieben worden, die ebenfalls über einige Ketosteroidmessungen berichtet und hierbei zu einem Verhältnis von 1:2,49 gekommen ist.

Fernerhin konnte festgestellt werden, daß auftretende Schwankungen in der Bestimmung der neutralen 17-Ketosteroide mit den Werten zwischen der gereinigten und ungereinigten Fraktion synchron erfolgen. Hiermit kann die Erfahrung von S t o c k (47) vollauf bestätigt werden, daß durch die Bestimmung der neutralen 17-Ketosteroide mit Hilfe der m-Dinitrobenzolreaktion nach Z i m m e r m a n n (57) mit und ohne Entfernung der Harnfarbstoffe durch das G i r a r d - Reagens T praktisch gleich gute Ergebnisse erzielt werden. In Anbetracht des erheblich größeren Zeit- und Materialaufwandes bei der Bestimmung der gereinigten 17-Ketosteroide kann man für viele Fälle vor allem für Routineanalysen der Bestimmungsmethode der ungereinigten Fraktion den Vorzug geben.

In diesem Zusammenhang haben die Schlußfolgerungen von Mixner, Saunders und Johnston (28), die in der Fraktion der 17-Ketosteroide im Harn der Rinder mehrere unspezifische Verbindungen nachgewiesen haben wollen, nicht ein solch entscheidendes Gewicht und zwar vor allem nicht im Hinblick auf die Beurteilung der Nebennierenrindenaktivität.

Eine zweite Frage war die Ermittlung des Bezugssystems für die gefundenen Ketosteroidkonzentrationen. Die Durchsicht früherer Arbeiten (4, 47) sowie die hier gewonnenen Ergebnisse lassen erkennen, daß weniger die Beziehung mg/Ketosteroide pro 24 Stunden-Harn als die Angabe in mg/Ltr., allerdings

aus einer homogenen Portion gewonnen, die am besten reproduzierbaren Werte ergibt. Dies gilt vor allem im Hinblick auf die Beobachtung, daß die Untersuchung von Tieren zu verschiedenen Jahreszeiten und damit bei verschiedener Fütterung in dieser Relation die übereinstimmendsten Werte erkennen lassen.

1. Zur Exkretion der neutralen 17-Ketosteroide bei Jung- rindern

Im Zusammenhang mit dieser Arbeit sind insgesamt sechs Jungrinder auf ihre Ketosteroideausscheidung überprüft worden. Dabei hat sich zunächst herausgestellt, daß eine Geschlechtsunterschiedlichkeit in diesem Lebensalter noch nicht eingetreten war. Im einzelnen ergab sich bei den drei viermonatigen Jungrindern eine Ketosteroideausscheidung in der ungereinigten Fraktion von 17,8 mg/Ltr. und in der gereinigten von 6,4 mg/Ltr. Bei den drei fünfmonatigen Jungrindern betrug die Ausscheidung der ungereinigten Ketosteroide 25,9 mg/Ltr. und die der gereinigten 10,0 mg/Ltr.

Gemessen an den Zahlenwerten mag eine Differenz zwischen diesen beiden im Lebensalter von vier Wochen unterschiedenen Jungrindergruppen gegeben sein. Dieser ist jedoch nur aufrecht zu erhalten, wenn das Jungrind I mit seinem extrem niedrigen Wert in die Berechnung mit eingezogen wird. Dieser kann nach der vorliegenden Erfahrung aber nicht als normal angesehen werden.

Im Gegensatz hierzu hat S t o c k (47) festgestellt, daß jüngere Kälber und zwar im Alter von drei bis vier Wochen etwa 1,8 mg/Ltr. ungereinigte 17-Ketosteroide ausscheiden. Diese Ergebnisse sind gewonnen auch an den Jungrindern II, III, IV, VI, die in dieser Arbeit ebenfalls untersucht worden sind.

Die Ergebnisse der Jungrinder zusammengekommen - das Jungrind I mit dem deutlich erniedrigten und mit Sicherheit nicht normalem Ausscheidungswert - ergibt damit einen Durchschnitt von 24,9 mg/Ltr. ungereinigter Ketosteroide. Dies entspricht einer Ausscheidung von gereinigten 17-Ketosteroiden von 9,4 mg/Ltr. Werden diese Größen mit der späteren, gereinigten Ketosteroidausscheidung der Bullen verglichen, so entsteht der Eindruck, daß diese Tiere im Alter von vier bis fünf Monaten ihre höchste Ausscheidung schon fast erreicht haben.

2. Zur Exkretion der neutralen 17-Ketosteroide der Bullen.

Gemessen in der 24 Std.-Harnportion haben die Bullen im Durchschnitt 27,2 mg/Ltr. ungereinigte 17-Ketosteroide im Harn ausgeschieden. Diesem Wert steht nach der G i r a d - Reinigung dieser Fraktion eine Menge von 10,5 mg/Ltr. gegenüber. Diese Werte stimmen im großen ganzen überein mit denen, die S t o c k (47) 1957 veröffentlicht hat. Ein Ausscheidungsdurchschnitt von fünf Bullen ergab hier an ungereinigten Ketosteroiden 22,6 mg/Ltr. und in der gereinigten Fraktion 8,2 mg/Ltr.

Zu den in dieser Arbeit ermittelten Werten ist zu sagen, daß die angegebenen Ausscheidungsgrößen nicht auf Grund einer Meßperiode gewonnen sind, die im Durchschnitt acht Tage dauerte, sondern daß spätestens nach sechs Monaten also zu einer anderen Jahreszeit und damit anderer Futterzusammensetzung wiederholt worden sind. Hierbei haben sich keine ins Gewicht fallenden Unterschiede zwischen diesen Messungen ergeben.

Im Zusammenhang mit der 17-Ketosteroidbestimmung war es wichtig die Frage zu prüfen, ob bei Zugrundelegung des 17-Ketosteroidwertes angegeben in mg/Ltr. nicht auch eine Harnteilportion zu den gleichen reproduzierbaren Werten führt (17). Die Vorteile eines solchen Vorgehens liegen auf der Hand: Das umständliche und aufwendige Befestigen und Gewöhnen an ein Urinal entfällt, denn die Abnahme einer Teilportion kann jederzeit durch Auffangen des Harnes zu einer Zeit erfolgen, in der man einen Harnabsatz für gewöhnlich erwarten kann.

Bevor jedoch ein solches Vorhaben empfohlen werden kann, sind deshalb bei vier Bullen mehrere Tagesportionen auf ihren 17-Ketosteroidgehalt bestimmt worden, nachdem zuvor die Gesamtausscheidungsgröße festgelegt worden ist.

Aus den Abbildungen 1 - 4 ist ersichtlich, daß der mg/Ltr.-Wert zwischen 10 und 13 Uhr das erste und zwischen 19 und 1 Uhr das zweite Maximum während eines Tages erkennen läßt. Dieses Verhalten ist einheitlich bei den drei hinreichend oft untersuchten Tieren. Hieraus sind zwei Maxima der Nebennierenrindenaktivität während eines Tages abzuleiten. Dazu muß allerdings bemerkt werden, daß die Ausscheidungsergebnisse zeitlich mit der Nebennierenrindenaktivität bei so kleinen Bestimmungszwischenräumen nicht unbedingt übereinstimmen müssen. Die Zeit, die zwischen erhöhter Nebennierenrindenaktivität und der Ausscheidung der Metaboliten dieser

Drüse in die Harnblase vergeht und weiter von hier wiederum bis zum Vorgang des Harnabsatzes, konnte in diesen Untersuchungen nicht bis ins einzelne geklärt werden. Bei Bulle C wurde jeweils der innerhalb von acht Stunden abgesetzte Harn analysiert. Es zeigte sich hierbei, daß dieser Zeitraum bereits so groß ist, daß die deutlichen Tagesrhythmen schon weitgehendst verschwimmen.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

1. Sechs Jungrinder und Bullen wurden auf ihre Ausscheidung an neutralen 17-Ketosteroiden im Harn untersucht, wobei wir von diesen Tieren zunächst den 24-Stunden-Harn analysierten. Außerdem ist an vier Tieren zusätzlich eine Untersuchung der Tagesschwankungen vorgenommen worden.
2. Die Untersuchung der Ausscheidung an neutralen 17-Ketosteroiden im Harn erfolgte mit der m-Dinitrobenzolreaktion nach Zimmermann (57) und zwar mit (sog. gereinigte 17-Ketosteroide) und ohne (sog. ungereinigte 17-Ketosteroide) Entfernung störender Harnfarbstoffe durch das Verfahren von Girard und Sandulesco (8).
3. Die Jungrinder scheiden nach der Methode ohne Vorreinigung 24,9 mg/Ltr. und nach der Reinigung des Extrakts 9,4 mg/Ltr. 17-Ketosteroide aus.
4. Die Bullen exkretieren, gemessen in der ungereinigten Fraktion, 27,2 mg/Ltr. und nach der Reinigung 10,5 mg/Ltr. 17-Ketosteroide.
5. Das spezifische Gewicht des Harnes und die Ketosteroidwerte in mg/Ltr. schwanken synchron im Verlauf eines Tages, wobei sich regelmäßig zwei Maxima zeigen.
6. Um allgemeingültige Aussagen über den Funktionszustand der Nebennierenrinde machen zu können, muß künftig eine aus dem 24-Stunden-Harn genommene homogene Teilportion auf den Gehalt an mg-Ketosteroiden untersucht werden.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Abelin, J. Spezielle klinisch-chemische Methoden.
Verlag Hans Huber, Bern und Stuttgart 1952
2. Bahner, Friedr. Funktionsproben des Hypophysen-Nebennierenrinden-
Systems. Erstes Freiburger Symposium S.125, Springer-
Verlag (1953)
3. Bloch, K. The use of isotopes in hormone problems.
The biological synthesis of cholesterol.
Rec. Progr. Hormone Res., 6 , 111 (1951)
4. Brüggemann, J., Bronsch K., Stubenrauch, M.
Über den inneren und äußeren Stoffwechsel des
gesunden und kranken Haustieres.
III. Mitteilung: Das funktionelle Verhalten von
Hormonsystemen bei normalen und entwicklungs-
gestörten Schweinen.
Zentralbl.f.Vet.Med.I, 4 , 342 (1954)
5. Bush, J.E. Paper-chromatographic study of the secretion
of the adrenal cortex.
J. of Physiol., 115 Proc. (1951)
6. Conn, J.W.L.H.Louis und S.S.Fajans.
The probability that compound F
(17-hydroxycorticosterone) is the hormone produced
by the normal human adrenal cortex.
Science (Lancaster, Pa.), 113 , 713 (1951)
7. Mc. Ginty, D.A. G.N.Smith, M.L.Wilson and C.S.Worrel:
Science (Lancaster, Pa.), 112 , 506 (1950)
8. Girard, A. und Sur une nouvelle série de réactifs du groupe carbonyle,
Sandulesco, G. leur utilisation à l'extraction, des substances cétoniques

et à la caractérisation microchimique des
aldéhydes et cétones.

Helv.chim.Acta, 19, 1095 (1936)

9. Granata, L. Boll. Soc. ital. Biol. sper., 27, 228 (1951)
10. Hayano, M. and R.J.Dorfmann The action of adrenal homogenates on progesterone, 17-hydroxyprogesterone and 21-desoxycortisone. Arch. Biochem. and Biophys., 36, 237 (1952)
11. Hayano, M. R.J.Dorfmann and D.A.Prins Metabolism of the steroid hormones. Conversion of desoxycorticosterone to glycogenic material in vitro. Proc.Soc.Exper.Biol.a. Med., 72, 700 (1949)
12. Hayano, M. and R.J.Dorfmann The conversion of desoxycorticosterone to glycogenic material by adrenal homogenates. and E.Y.Yamada J. of Biol. Chem., 193, 175 (1951)
13. Heard, R.D.H. Aus G.Pincus, K.V.Thimann, The hormones Vol.I (1948)
14. Heard, R.H.Sobel, E.H.Venning The neutral lipide-soluble reducing substances of urine as index of adrenal cortical function. J.Biol.Chem., 165, 699 (1946)
15. Hechter, O.A.Zaffaroni, R.P.Jacobsen, H. Levy, R.W.Jeanloz, V. Schenker and G. Pincus: The nature and the biogenesis of the adrenal secretory product. Rec.Progr.Hormone Res., 6, 215 (1951)
16. Higgins, G.M., K.A.Woods and E.C.Kendall: Some observations on the physiologic activity of Δ^4 -dehydrocortisone (Diene) Endocrinology (Springfield, I 11), 48, 175 (1951)

17. Holcombe, R.B. The excretion of reducing corticoids and neutral steroids in the urine of cows with parturient paresis.
The Brit. Vet. J., 109, 359 (1953)

18. Hoppe, Seyler- Handbuch der physiologisch- und pathologisch-
Thierfelder chemischen Analyse.
10. Aufl., 3. Bd., II. Teil, Springer-
Verlag 1955, S. 1524-1536

19. Ingle, D.J., E.H. Morley
and J.E. Nezamis Quantitative biologic activity of
dehydrocortisone as compared to
cortisone. Proc. Soc. Exper. Biol.
and Med., 78, 220 (1951)

20. Junkmann, K. Zentrale Steuerung der Sexualfunktionen.
Androgene: Chemie, Biochemie und Nach-
weis. 1. Symposium d. deutschen Ges. f.
Endokrinologie. Springer-Verlag 1953

21. Kahnt, F.W. und Die 11-Oxydation von Desoxy-Cortico-
A. Wettsein steron und Reichstein's Substanz S
mit Hilfe tierischer Organhomogenate.
Bildung von Corticosteron und 17-
Oxy-corticosteron. Helvet. chim. Acta,
34, 1790 (1951)

22. Kendall, E.C. Proc. Staff. Meet Mayo Clin., 12,
136 (1937)

23. Laszt, L. Physiologie des ACTH und der Nebennieren-
rindesterioide / Erstes Freiburger
Symposium S.40, Springer-Verlag 1953

24. Laszt, L. Schweiz.med.Wschr., 81, 107 (1951)

25. Laszt, L. and Die Störungen des Kohlenhydrat-Stoffwechsels
F. Verzár bei Ausfall der Nebennierenrinde und ihr Zu-
sammenhang mit dem Na-Stoffwechsel. Biochem.
Z., 292, 159 (1957)

26. Long, C.N.H. The relation of cholesterol and ascorbic acid to the secretion of the adrenal cortex. *Rec. Progr. Hormone Res.*, 1, 99 (1947)

27. Meschaks, P. Excretion of neutral steroids in the urine of bulls with warmth- induced aspermia in mammalian germ cells. Little, Brown a.Comp.Boston 1953

28. J.P.Mixner,
H.L.Saunders and
J.C.Johnston Untersuchung einiger Chromogene im Kuh-
harn
J.Dairy, Sci., 40, 67-74 (1957)

29. Nelson, D.H.,
H.Reich and
L.T.Samuels *Science (Lancaster, Pa.)*, 111, 578 (1950)

30. Nelson, D.H.,
L.T.Samuels and
H.Reich 2nd Clinical-ACTH Conference, Vo. I,
p. 49 (1951)

31. Nelson, D.H.,
L.T.Samuels,
D.G.Willardson
and F.H.Tyler The levels of 17-hydroxycorticosteroids
in peripheral blood of human subjects.
J.Clin.Endocrin., 11, 1021 (1951)

- Nelson, D.H. and
 L.T.Samuels A method for the determination of 17-
hydroxycorticosteroids in blood:
17-hydroxycorticosterone in the
peripheral circulation. *J. Clin.*
Endocrin., 12, 519 (1952)

32. Nissim, J.A. *Endocrinol.*, 8, 257 (1952)

33. Pickford, M. and
M. Vogt The effect of adrenaline on secretion
of cortical hormone in the hypophysecto-
mized dog.*J. of Physiol.*, 112, 133 (1951)

34. Pincus, G.,
O. Hechter and
A. Zaffaroni 2nd clinical ACTH conference Vol.I,
p. 40, 1951
35. Reich, H.,
D.H.Nelson and
A.Zaffaroni Isolation of 17-hydroxycorticosterone
from blood obtained from adrenal veins
of dogs. J. of Biol. Chem., 187, 411 (1950)
36. Reichstein, T. Chemie der Nebennierenrinden-Hormone.
Bull.schweiz.Akad.Med.Wiss., 7, 359 (1951)
37. Reichstein, T. Chemie der Nebennierenrinden-Hormone.
Chimia, 4, 21, 47 (1950)
38. Reichstein, T. Chemie des Cortins und seiner Begleit-
stoffe. Erg. Vitamin- und Hormonforschung,
1, 334 (1938)
39. Samuels, L.T.,
M.L.Helmreich,
M.B.Lasater and
H.Reich An enzyme in endocrine tissues which
oxidizes 3-hydroxy steroids to unsaturated
ketones. Science (Lancaster, Pa.), 113,
490 (1951)
40. Savard, K.,
A.A.Green and
L.A. Lewis Oxydation of 11-desoxycorticosteroids
with adrenal tissue homogenates,
Endocrinology (Springfield, I 11),
47, 418 (1950)
41. Savard, K.,
W.J.Kolff and
A.C.Corcoran Corticosteroids of peripheral blood.
Endocrinol., 50, 366 (1952)
42. Schneider, J.J.and
P.M.Horstmann Effects of incubating desoxycorticosterone
with various rat tissues.
J. of Biol. Chem., 191, 327 (1951)

Effects of incubating compound E and
related steroids with various surviving
rat tissues. J. of Biol. Chem., 196, 629 (1952)

43. Selye, H. and V. Schenker A rapid and sensitive method for bioassay of the adrenal cortical hormone. Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med., 39, 518 (1938)

44. Seneca, H.E., Ellenbogen, E., Henderson, A., Collins and J. Rockenbach Science (Lancaster, Pa.), 112, 524 (1950)

45. Staudinger, HJ. Biochemie der Nebennierenrindensteroid- und des ACTH, Erstes Freiburger Symposium, S. 1, Springer-Verlag 1953

46. Staudinger, HJ. Die Biosynthese der Nebennierenrindenhormone. Erstes Freiburger Symposium Springer-Verlag 1953

47. Stock, C. Zur Bestimmung der Aktivität der Nebennierenrinde bei Rindern. Vet. med. Dissertation, München 1957

48. Sweat, M.L. Enzymatic. Synthesis of 17-hydroxycorticosterone. J. Amer. Chem. Soc., 73, 4056 (1951)

49. Swingle, W.W. and J.J. Pfiffner J. Physiol., 96, 153, 164 (1931) 98, 144 (1931)

50. Vestling, C.S. and G.F. Lata Steroid changes in incubating adrenal homogenates. Science (Lancaster, Pa.), 113, 582 (1951)

51. Vogt, M. Regulation of secretion of cortical hormones. Brit. Med. J., 1950, 1242

52. Vogt, M. Biological assays of cortical hormones and estimation of the rate of secretion of the mammalian suprarenal cortex. J. of Endocrin., 5, 57 (1948)

54. Vogt, M. siehe 51. Pos. 3
55. Vogt, M. J. Physiol. Chem., 102, 341 (1943)
56. Wintersteiner, O. Chemical studies on the adrenal cortex.
and J.J. Pfiffner III. Isolation of two new physiologically
inactive compounds.
J. of Biol. Chem., 116, 291 (1936)
57. Zimmermann, W. Die 17-Ketosteroide, ihre Bedeutung
und die Methodik ihrer Bestimmung.
Dtsch. Med. Wschr., 76, 1363 (1951)

Nach Beendigung meiner Arbeit möchte ich meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. Dr. Johannes Brüggemann, für die Stellung dieser Aufgabe recht herzlich danken.

Ferner sei Herrn Privatdozent Dr. Kurt Bronsch aus dem Institut für Physiologie und Ernährung der Tiere für die Förderung und Anregung meiner Arbeit vielmals gedankt.

LEBENS LAUF

Am 17. August 1932 wurde ich, Wilhelm Binder, als Sohn des Metzgermeisters Ludwig Binder und seiner Ehefrau Josefa, geb. Machane, in Tittmoning geboren.

Nach dem Besuch der Volksschule in Tittmoning von 1939 bis 1943 trat ich in die Oberschule in Traunstein ein. Am 9.7.1953 legte ich an der Karls-Oberrealschule in Bad Reichenhall die Reifeprüfung ab.

Im Wintersemester 1953/54 begann ich mein Studium an der tierärztlichen Fakultät der Universität München, der ich während meiner ganzen Studienzeit angehörte. Im Juli 1958 beendete ich mein Studium mit dem tierärztlichen Staatsexamen.

